

Untersuchungen
zum serologischen Nachweis
der Bakteriellen Nierenerkrankung
(BKD) der Salmoniden

Margit Schauner

*Oss
München
1956*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0069

Aus dem Institut für Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf und Prof. Dr. R. Hoffmann
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. R. Hoffmann

Untersuchungen zum serologischen Nachweis der
Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Margit Schauer
aus
Trostberg/Deinting

München 1985

* Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten dankenswerterweise
unterstützt.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann
Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinem Opa

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Literaturbesprechung	2
1. Salmoniden: Systematik	
2. Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden - BKD	3
2.1. Entdeckung und Verbreitung	3
2.2. Bakterium: Morphologie, biochemische Eigenschaften, Aufbau und Taxonomie	6
2.3. Erkrankte Fischarten	9
2.4. Pathologisch-anatomisches Bild	14
2.4.1. Makroskopisch	14
2.4.2. Mikroskopisch (histologisch und elektronenoptisch)	18
2.5. Pathogenese und Epizootologie	21
3. Diagnose	28
3.1. Bakteriennachweis	28
3.1.1. Bakterienfärbung im Organabklatsch oder Schnittpräparat	28
3.1.2. Anzucht des Erregers	29
3.1.3. Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony	32
3.1.4. Immunofluoreszenzfärbung - IF	34
3.1.4.1. Direkte Immunofluoreszenzfärbung - dIF	35
3.1.4.2. Indirekte Immunofluoreszenstechnik - IFAT	36
3.1.5. Koagglutination	37
3.2. Nachweis von Antikörpern gegen "Renibacterium salmoninarum"	39
3.2.1. Agglutinationsmethode	39
3.2.1.1. Objektträgerschnellmethode	40
3.2.1.2. Mikrotitermethode	40
4. Differentialdiagnose	43

	Seite
5. Fischimmunologie	50
5.1. Immunkompetente Organe	50
5.2. Immunsystem der Fische	52
5.2.1. Unspezifische Immunität	52
5.2.2. Spezifische Immunabwehr	54
5.2.3. Antikörper beim Fisch	55
5.2.4. Einflüsse auf die Immunantwort von Fischen	65
III. Eigene Untersuchungen	67
1. Material	67
1.1. Bakterien	67
1.2. Fische	68
1.2.1. Zur BKD-Diagnostik eingesandte Fische	68
1.2.2. Versuchsfische	68
1.3. Fischseren	68
1.4. Kaninchen	68
1.5. Sonstige Seren	68
1.6. Medien und Puffer	69
2. Methoden	71
2.1. Herstellung von Immunseren im Kaninchen	71
2.2. Serengewinnung aus Fischen	71
2.3. Sektion	71
2.4. Anzucht des Erregers	72
2.5. Indirekte Immunofluoreszenz - IFAT	73
2.6. Doppelimmunodiffusion nach Ouchterlony - DID	75
2.7. Agglutination	77
2.7.1. Objektträgermethode	78
2.7.2. Mikrotitermethode	78
2.8. Hämagglutinationshemmungsreaktion - HAH	78
3. Infektionsversuche	82
3.1. Versuchsbedingungen	82
3.2. Infektionart und -dosis	82
3.3. Versuchsansätze	83
3.4. Versuchsablauf und vorgenommene Untersuchungen	84

	Seite
4. Ergebnisse	85
4.1. Kaninchen-Antiseren	85
4.1.1. Kaninchen-Antiseren in der Indirekten Immuno- fluoreszenz - IFAT	85
4.1.2. Nachweis von spezifischen, präzipitierenden Antikörpern durch Doppelimmunodiffusion (DID) in den Kaninchen-Anti-KD-Seren	87
4.1.3. Nachweis spezifischer agglutinierender Antikör- per gegen "Renibacterium salmoninarum" in den Kaninchen-Anti-KD-Seren	92
4.1.4. Untersuchung der Kaninchen-Antiseren auf häm- agglutinationshemmende Antikörper gegen "Reni- bacterium salmoninarum"	94
4.2. Infektionsversuche	96
4.3. Fische und Fischseren	106
4.3.1. Material und Verteilung auf die einzelnen Fischspezies	106
4.3.2. Regenbogenforellen (<i>Salmo gairdneri</i>)	108
4.3.3. Bachforellen	108
4.3.4. Restliche Salmoniden	131
4.3.5. Nicht-Salmoniden	134
4.3.6. Untersuchung der Fischseren mit der Doppel- immunodiffusion (DID) nach Ouchterlony	136
IV. Diskussion	137
V. Zusammenfassung	145
VI. Summary	147
VII. Literaturverzeichnis	149
Lebenslauf	

I. Einleitung

Der Erreger der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden ist "*Renibacterium salmoninarum*", ein kleines, grampositives Stäbchen. Die Infektion mit diesem Bakterium führt zu einer akuten oder chronisch-schleichenden Erkrankung mit erheblichen Verlusten. Diese Krankheit wurde in der Bundesrepublik Deutschland 1984 zum ersten Mal bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) beschrieben (HOFFMANN et al., 1984).

In der Zwischenzeit wurde die BKD auch bei Huchen (*Hucho hucho*), Seesaibling (*Salvelinus alpinus*) und Äschen (*Thymallus thymallus*) festgestellt (PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b; KETTLER et al., 1985).

Da der Nachweis der BKD durch fluoreszenzserologische und kulturelle Methoden oft schwierig ist und insbesondere "Carrier"-Fische kaum erfaßt werden konnten (FRYER und SANDERS, 1981), wurden in der vorliegenden Arbeit serologische Methoden erprobt, um für die Praxis bessere Möglichkeiten einer Bestandskontrolle zu bekommen.

II. Literaturbesprechung

1. Salmoniden: Systematik

Von den Teleosteen gehört die Unterordnung der Salmoniden oder Lachsartigen (Salmonidea) laut STEITZ und STENGEL (1984) zur Ordnung der Salmoniformes (Lachsfische), die in Süßwasser und Salzwasser vorkommen. Sie besitzen Cycloidschuppen, eine physostome Schwimmblase, kieferendständige Zähne, Flossen mit Weichstrahlen (ohne Stacheln) und eine Fettflosse. Zu den Lachsartigen zählen:

- Salmo salar* - Atlantischer Lachs
- Hucho hucho* - Donaulachs, Huchen
- Oncorhynchus* spp. - Pazifiklachse
- Salmo trutta* - Forelle
- Salmo gairdneri/iridens* - Regenbogenforelle
- Coregonus* spp. - Renken, Maränen, Felchen
- Osmerus eperlanus* - Stint
- Thymallus* - Äsche

Bei REMANE et al. (1980) werden die Coregonidae (Renken) und die Thymallidae (Äschen) nicht mehr zu den Salmonidae gerechnet.

Zur Familie der Salmonidae gehören laut CARL et al. (1977) Lachs, Forelle und der Saibling. Zu den Saiblingen (Genus *Salvelinus*) zählen unter anderem *Salvelinus alpinus* (Seesaibling), *Salvelinus namaycush* (Kanadische Seeforelle) und *Salvelinus fontinalis* (Bachsaibling). Forellen sind die Bachforelle (*Salmo trutta*) und die Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*). Dem Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) stehen die Pazifiklachse (*Oncorhynchus* spp.) gegenüber. Es gibt unter anderem Buckellachs (Pink Salmon, Humpback Salmon; *Oncorhynchus gorbuscha*), Silberlachs (Silver oder Coho Salmon; *O.kisutch*), Königsachs (Chinook, Spring oder King Salmon; *O.tshawytscha*), Hundslachs (Chum bzw. Dog Salmon; *O.keta*) und Sockeye- bzw. Kokanee-Lachs (Red, Sockeye, Kokanee Salmon; *O. nerka*).

2. Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden - BKD

Die Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD, Bacterial Kidney Disease) ist eine systemische Erkrankung, die sich im klinischen Verlauf meist chronisch (FRYER und SANDERS, 1981), aber auch akut bis subakut darstellt.

Als Erreger der BKD wurde "*Renibacterium salmoninarum*" (SANDERS und FRYER, 1980), ein kleines, gram-positives, unbewegliches Stäbchen isoliert, das sehr langsam wächst und spezielle Ansprüche an das Kulturmedium stellt. Die Diagnose "BKD" läßt sich anhand des typischen pathologisch-anatomischen Bildes, mittels histologischer Methoden und aufgrund von Anzucht des Erregers, sowie serologischer Untersuchungen stellen.

Die Infektion führt im chronischen Fall zu Granulomen in der Niere, Leber und Milz (FRYER und SANDERS, 1981), sowie zu Ulzerationen der Haut und Augenveränderungen (KLONTZ, 1982).

2.1. Entdeckung und Verbreitung

Die ersten nachgewiesenen Fälle von "Bakterieller Nierenerkrankung der Salmoniden" stammen aus den Jahren 1930-33. MACKIE, ARKWRIGHT und PRYCE-TANNATT (1933) berichteten von 15 Atlantischen Lachsen (*Salmo salar*) aus den Flüssen Dee und Sprey in Schottland, die ein charakteristisches Krankheitsbild zeigten. Die Krankheit wurde "Dee Disease" genannt. In den Organen der Fische konnte ein kleines, gram-positives Bakterium färberisch nachgewiesen werden. Ein Übertragungsversuch auf die Bachforelle (*Salmo trutta*) durch subkutane bzw. intramuskuläre Injektion von Organmaterial der befallenen Lachse verlief positiv.

In den Jahren 1933-34 trat die Krankheit bei Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) und Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) in einer staatlichen Fischzucht in Massachusetts, U.S.A. zum ersten Mal auf.

BELDING und MERRILL (1935) beobachteten neben Hautveränderungen und Organabszessen vor allem beidseitigen Exophthalmus bei den befallenen Fischen. Als Erreger konnte ein kleines, gram-positives Bakterium in gramgefärbten Organpräparaten nachgewiesen werden.

Von 1935-36 liegen nach KLONTZ (1982) Berichte über Fälle einer systemischen bakteriellen Infektionskrankheit, die mit Nieren-, Leber- und Milzveränderungen einherging, bei Bach- und Regenbogenforellen, sowie Bachsaiblingen in kalifornischen Fischzuchten vor. In den Jahren 1953-60 gab es zahlreiche Fallbeispiele aus Schottland, den U.S.A. und Kanada: RUCKER et al. (1953) und EARP et al. (1953) beschreiben die Krankheit bei pazifischen Lachsen (Gattung: *Oncorhynchus*) sowohl aus Fischzuchten, als auch aus Freigewässern in den U.S.A. und weisen ein kleines ($0,3-0,5 \times 0,6-1,0 \mu\text{m}$), gram-positives Stäbchen in Organabklatschen nach. SNIESZKO und GRIFFIN (1955) berichten über BKD bei Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*), Bachforelle (*Salmo trutta*) und Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) in den Staaten New Hampshire und New York. MACLEAN und YODER (1970) schildern die BKD im Staate Michigan von 1955-61 bei pazifischen Lachsarten (*Oncorhynchus tshawytscha*, *kisutch* und *nerka*), Bachsaibling und Seeforelle (*Salvelinus namaycush*). SMITH (1964) kommt zu dem Schluß, daß die von 1955-64 in Schottland immer wieder beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) auftretende "Dee Disease" identisch mit der in Nordamerika beschriebenen "Kidney Disease" (BKD) ist. Sie führt den Nachweis anhand der makroskopischen Veränderungen, des histologischen Befundes bzw. der Gramfärbung und mit der Anzucht des Bakteriums aus erkrankten Fischen. WOOD und YASUTAKE (1956) stellten in ihrem histologischen Vergleich der BKD bei Bachforelle, Coho- und Chinook-Lachsen zwischen den Ost- und Westküstenstaaten der U.S.A. fest, daß es sich um ein und dieselbe Krankheit handelt. Aus Kanada liegen erste Berichte über erkrankte Pink Lachse (*Oncorhynchus gorbuscha*) von BELL (1961) und über Atlantische

Lachse (*Salmo salar*) in den Jahren 1957-69 aus dem Margaree River von PIPPY (1969) vor.

Von 1968-79 findet sich die BKD der Salmoniden in der Nord-amerikanischen Literatur sehr häufig: FRYER und SANDERS (1981), WARREN et al. (1963: BKD in 40 Fischzuchten), EVELYN et al. (1973), MITCHUM et al. (1979), FRANTSI (1975), ELLIS et al. (1978), PATERSON et al. (1979 und 1981 b), LALLIER et al. (1981).

In Europa isolierten GHITTINO et al. (1977) in Italien aus Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) einer Fischzucht den BKD-Erreger; im selben Jahr 1973 stellte FIJAN (1977) BKD bei Regenbogen- und Bachforellen in Jugoslawien fest. MILLAN (197) führte in Spanien den kulturellen Nachweis der Krankheit aus Lachszuchtanstalten.

KINKELIN (1974), ALDRIN et al. (1977) und VIGNEUILLE et al. (1977) beschreiben in Frankreich bei den pazifischen Lachsarten *Oncorhynchus tshawytscha* und *O. kisutch* Fälle von BKD.

Berichte aus Japan stammen von KIMURA und AWAKURA (1977); sie führten pathologisch-anatomisch, histologisch, kulturell und serologisch den Nachweis der BKD ab 1973-74 auf Hokkaido bei dort gezüchteten pazifischen Lachsen (*Oncorhynchus nerka*, *O. tshawytscha*, *O. gorbuscha*, *O. masou*).

In der Bundesrepublik Deutschland wurde die BKD zum ersten Mal von HOFFMANN et al. (1984) bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*), Silber-Lachsen (*O. kisutch*) und Bachforellen (*Salmo trutta*) in einer Teichwirtschaft und einem zugehörigen Freigewässer beschrieben. Zahlreiche weitere BKD-Fälle im süddeutschen Raum und in Tirol wurden von PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 a, b) geschildert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Bakterielle Nierenerkrankung (BKD) nur bei Gattungen der Salmonidae auftritt.

Befallen können sowohl Fische aus Fischzuchten, als auch aus Freigewässern sein. Die Krankheit hat ihr Hauptverbreitungsgebiet bisher in Großbritannien und Nordamerika, aber auch Europa und der Ferne Osten sind betroffen.

2.2. Bakterium: Morphologie, biochemische Eigenschaften, Aufbau und Taxonomie

Weder MACKIE et al. (1933) noch BELDING und MERRILL (1935) gelang die In-vitro-Kultivierung der von ihnen in Organabklatschen gefundenen gram-positiven, kleinen Diplokokken auf "üblichen Kulturmedien".

ORDAL und EARP (1956) entwickelten einen Blut-Cystein-Agar, auf dem nach 9-10 Tagen bei 17 °C Kolonien gram-positiver, kurzer Stäbchen von ca. 0,3-0,5 µm x 0,5-1,0 µm Größe sichtbar wurden. Das Bakterium war proteolytisch, bildete Katalase, aber keine Endosporen. Wegen seines pleomorphen Aussehens und paarweisen bis kettenförmigen Auftretens wurde es den Corynebakterien (*Corynebakterium salmoninarum*) zugeordnet. SMITH (1964) beschrieb auf dem Ordal-Earp-Medium nach 14 Tagen bei 15 °C weiße bis cremefarben-gelbliche, runde, erhabene, glatt-glänzende Kolonien von variabler Größe; diese bestanden aus kurzen, unbeweglichen, gram-positiven Stäbchen (1,5 x 1,0 µm), die Proteolyse zeigten. Sie wiesen keine Kapsel oder Endosporenbildung auf und waren nicht säurefest und nicht gelatineverflüssigend. Das Wachstum war bei 5-22 °C (Optimum bei 15 °C), nicht aber bei 37 °C zu beobachten. SMITH (1964) konnte ebenso Pleomorphie der Stäbchen ("Chinese letter formation") feststellen.

ROBERTS (1978) ordnet die für die "Kidney Disease" (BKD) verantwortlichen gram-positiven Stäbchen (*Corynebakterium salmoninarum*) aufgrund ihres pleomorphen Aussehens (teils verzweigte, keulenartige Schwellungen, palisadenförmige Anordnung) ebenso den Corynebacteriaceae zu.

SANDERS und FRYER (1980) beschrieben die Kolonien von "*Renibacterium salmoninarum*" auf CSA-Agar (Cystein-Blut-Agar) nach ORDAL und EARP (1956) weiß-cremefarben bis gelblich, rund, erhaben und von variabler Größe. Auf einem modifizierten Müller-Hinton-Agar nach AUSTIN und RODGERS (1980) wuchsen nach 28 Ta-

gen bei 16 °C creme-weiße bis gelbliche, mattglänzende, schleimige, teils flache, teils erhabene Kolonien von durchschnittlich 1 mm Durchmesser.

Auf KDM-2 (Kidney-Disease-Medium-2) - bzw. SKDM (Selective-Kidney-Disease-Medium)-Nährböden nach EVELYN (1977) konnten FRYER und SANDERS (1981) ebenfalls runde, erhabene, cremefarben bis gelbliche Kolonien variabler Größe anzüchten.

Das Temperaturoptimum für das Wachstum unter aeroben Bedingungen in vitro stellt der Bereich von 15-18 °C dar; entsprechend langsam wächst das Bakterium im Bereich bis 5 °C bzw. bis 22 °C, keine Kolonien können bei 37 °C festgestellt werden (SMITH, 1964; KIMURA, 1978; SANDERS und FRYER, 1981; KLONTZ 1982). Das Bakterium weist bei biochemischen Untersuchungen (SMITH, 1964; KIMURA, 1978; AUSTIN und RODGERS, 1980; SANDERS und FRYER, 1980) folgende Eigenschaften auf:

- + Proteolyse
- + Katalase
- Gelatineverflüssigung
- Cytochromoxidase
- + Arginindehydrolase
- + Caseindehydrolase
- + Methylrot
- + Phosphatase
- + Twen-40-Hydrolyse

Versuche zur In-vitro-Resistenz des Mikroorganismus gegen Chemotherapeutika bzw. Antibiotika (WOLF und DUNBAR, 1959 a; AUSTIN und RODGERS, 1980; SANDERS und FRYER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981) ergaben Empfindlichkeit für:

Ampicillin
Bacitracin
Chloramphenicol

Erythromycin
Furazolidon
Karbomycin
Novobiocin
Oxytetracyclin
Sulfonamide
Tetracyclin
Thiomycetin

Zum biochemischen Aufbau des Bakteriums selbst zeigen Untersuchungen von SANDERS und FRYER (1980) bzw. von FRYER und SANDERS (1981) einen Gehalt der DNA an Guanin und Cytosin von 53,00 +/- 0,46 mol%.

Die wichtigsten Aminosäuren des Zellwandpeptidoglykans stellen Lysin, Glutaminsäure, Glycin und Alanin dar, wobei bisher noch keine Sequenzanalyse vorgenommen wurde. Als wichtigste Zucker des Peptidoglykans der Bakterienzellwand gelten Rhamnose, Mannose, Glukose und Arabinose, wovon Glukose mit 41-123 µg/mg von insgesamt 80-150 µg/mg den größten Anteil hat (SANDERS und FRYER, 1980; FRYER und SANDERS, 1981). KUSSER und FIEDLER (1984) geben bei ihrer Analyse des Zellwandmureins für die Gehalte der wichtigsten Aminosäuren ein Verhältnis von Glutaminsäure : Lysin : Alanin : Glycin wie 1:1:4:1 an. Als wichtigste Aminosäure stufen sie bei dieser als besonders "charakteristisch" bezeichneten Mureinstruktur das Lysin ein. Als die wichtigsten Zucker des Zellwandpolysaccharids benennen sie die Zucker Galaktose, Rhamnose, N-acetyl-Fukosamin und N-acetyl-Glukosamin. Was die taxonomische Einordnung der Bakteriums betrifft, so wurde nach anfänglicher Zuordnung zu den Corynebacteriaceae (ORDAL und EARP, 1956; ROBERTS, 1978; AUSTIN und RODGERS, 1980) aufgrund der biochemischen Zusammensetzung der Zellwand von SANDERS und FRYER (1980) die Einführung eines neuen Genus *Renibacterium salmoninarum* sp. nov. gefordert; allerdings besteht laut SANDERS und FRYER (1980) eine nahe Ver-

wandtschaft zu der Gruppe Coryneformer Bakterien. Eine endgültige Zuordnung erfolgte bisher in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1974, 8.Auflage noch nicht. In der Literatur wird das "*Corynebacterium salmoninus*" heute aber meist als "*Renibacterium salmoninarum*" benannt.

2.3. Erkrankte Fischarten

In der Familie der Salmonidae (Lachsartige) Unterfamilie Salmoninae kommt nach KLONTZ (1982) die Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD) bei allen Arten der Genera *Oncorhynchus*, *Salmo* und *Salvelinus* vor. Bis dato waren noch keine Fälle von BKD bei *Coregonus* und *Thymallus* bekannt.

In Tabelle 1 findet sich eine Auflistung der Arten und beschreibenden Autoren mit BKD-Fällen bei wildlebenden Fischen und solchen aus Teichwirtschaften.

Besonders auffällig ist in der Literatur die große Häufigkeit von Angaben zur BKD bei Regenbogenforellen, Bachforellen, Silber-, Buckel- und Königslachsen. Zudem konnte die Krankheit auch bei *Hucho hucho*, dem Huchen, und *Thymallus thymallus*, der Äsche als Vertreter der Thymalliden nachgewiesen werden.

Tabelle 1: An BKD erkrankte Fischespezies

Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>)
- Rucker et al.(1954) - USA	- Belding und Merrill (1935) - USA
- Snieszko und Griffin (1955) - USA	- Rucker et al.(1954)- USA
- Piper (1961) - USA	- Smith (1964) - GB
- Warren (1963 a) - USA	- Fijan (1977) - JU
- Bullock et al.(1971) - V, USA	- Mitchum et al.(1979) - USA
- Evelyn et al.(1973) - C	- Bullock et al. (1980) - USA
- Bullock et al.(1974) - USA	- Mitchum und Sherman (1981) - USA
- Bullock und Stuckey (1975) - USA	- Pfeil-Putzien et al. (1985 a,b) - BRD
- Yamamoto (1975) - USA	
- Fijan (1977) - JU	
- Ghittino et al.(1977) - I	
- Bullock et al.(1978) - USA	
- Sanders et al.(1978) - V, USA	
- Mitchum et al.(1979) - USA	Cutthroat Trout (<i>Salmo clarki</i>)
- Laidler (1980) - GB	
- Mitchum und Sherman (1981) - USA	
- Kimura und Yoshimizu (1981 a,b) - J	Bullock et al (1971) - USA Fryer und Sanders (1981) - USA
- Lallier et al.(1981) - C	
- Bruno und Munro (1982) - V, GB	
- Austin et al.(1983) - V, GB	
- McCarthy et al.(1984) - V, USA	
- Hoffmann et al.(1984) - BRD	
- Pfeil-Putzien et al.(1985 a,b) - BRD	

Fortsetzung Tabelle 1:

Silberlachs

(*Oncorhynchus kisutch*)

- Rucker et al.(1954) - V, USA
- MacLean und Yoder (1970) - USA
- Bullock et al.(1971) - USA
- Bullock et al.(1974) - USA
- Aldrin et al.(1977) - F
- Suzumoto et al.(1977)- V, USA
- Sanders et al.(1978) - V, USA
- Aldrin et al.(1978) - V, F
- Sanders und Fryer (1980)- USA
- Iwama (1980) - V, C
- Iwama und Greer (1980) -V, C
- Evelyn et al.(1981) - V, C
- Kimura und Yoshimizu (1981
a,b) - J
- Evelyn et al.(1984) - V, C
- Hoffmann et al.(1984) - BRD
- Pfeil-Putzien et al.(1985
a,b) - BRD

Kokanee- bzw. Sockeye-Lachs

(*Oncorhynchus nerka*)

- Rucker et al.(1954) - USA
- Ordal und Earp (1956)- USA
- MacLean und Yoder (1970)
- USA
- Bullock et al.(1971) - USA
- Bullock et al.(1974) - USA
- Kimura und Awakura (1977) -J

- Kimura (1978) - J

- Sanders et al.(1978) - V,
USA

- Evelyn et al.(1981) - V,C

- Kimura und Yoshimizu

(1981 a,b) - J

- Pfeil-Putzien et al.(1985
a,b) - BRD

Königslachs

(*Oncorhynchus tshawytscha*)

- Rucker et al.(1954) - USA
- Ordal und Earp (1956)-USA
- MacLean und Yoder (1970)
- USA
- Bullock et al.(1971)- USA
- DeCew (1972) - V, USA
- Bullock et al.(1974)- USA
- Hendrick und Leeks (1975)
- USA
- Kimura und Awakura (1977)
- J

- Vigneuille et al.(1977)

- F

- Ellis et al.(1978) - USA

- Kimura (1978) - J

- Sanders und Fryer (1980)
- USA

- Iwama und Greer (1982)

- V, C

Fortsetzung Tabelle 1:

Buckellachs (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) -----	- Millan (1977) - SP - Paterson et al.(1979) - C - Paterson et al.(1981 a,b) - C
- Bell (1961) - C	
- Kimura (1978) - J	
Hundslachs (<i>Oncorhynchus keta</i>) -----	Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>) -----
- Kimura und Yoshimizu (1981) - J	- Belding und Merrill (1935) - USA - Snieszko und Griffin (1955) - USA
Amago-Lachs (<i>Amago salmon</i> , <i>O. rhodurus</i>) -----	- Allison (1958) - USA - Hunn (1964) - USA - Bullock et al.(1974) - USA - Yamamoto (1975) - USA - Young und Chapman (1978) - USA
- Kimura und Yoshimizu (1981 a,b) - J	
Kirschlachs (<i>Cherry/Yamabee salmon</i> , <i>Oncorhynchus masou</i>) -----	- Mitchum et al.(1979) - USA - Paterson et al.(1979) - C - Bullock et al.(1980) - USA - Bullock und Stuckey (1975) - USA
- Kimura und Awakura (1977) -J - Awakura (1978) - J - Kimura (1978) - J - Kimura und Yoshimizu (1981 a,b) - J	- Mitchum und Sherman (1981) - USA - Pfeil-Putzien et al.(1985 a,b) - BRD
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>) -----	Europäische Seeforelle (<i>Salmo trutta lacustris</i>) -----
- Belding und Merrill (1935) - USA - Smith (1964) - GB - Pippy (1969) - GB - Bullock et al.(1971) - USA	- Pfeil-Putzien et al. (1985 b) - BRD - Smith (1964) - GB

Fortsetzung Tabelle 1:

Nordamerikanische Seeforelle (<i>Salvelinus namaycush</i>)	Huchen (<i>Hucho hucho</i>)
-----	-----
- Bullock et al.(1971) - USA	- Pfeil-Putzien et al.(1985 a,
- Ehlinger (1963) - USA	b) - BRD
Seesaibling (<i>Salvelinus alpinus</i>)	Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)
-----	-----
- Pfeil-Putzien et al. (1985 a,b) - BRD	Kettler et al. (1985)

V - Reproduktion der Krankheit und ihrer Symptome unter
Versuchsbedingungen

BRD - Bundesrepublik Deutschland

C - Kanada

F - Frankreich

GB - Großbritannien

I - Italien

J - Japan

JU - Jugoslawien

SP - Spanien

USA - Vereinigte Staaten von Amerika

2.4. Pathologisch-anatomisches Bild

2.4.1. Makroskopisch

Bei den an "BKD" erkrankten bzw. gestorbenen Fischen zeigen sich sowohl äußerlich als auch innerlich eine Reihe charakteristischer Veränderungen, von denen die der Haut, des Auges und der Niere im Vordergrund stehen. Die Symptomatik der Niere gab der Krankheit auch ihren Namen: "Bacterial Kidney Disease". Die folgende Tabelle 2 faßt die allgemeinen Angaben von RUCKER et al. (1953), ROBERTS (1978), SCHÄPERCLAUS (1979), POPP (1980), SANDERS und FRYER (1980), FRYER und SANDERS (1981) und KLONTZ (1982) zusammen:

Tabelle 2: Übersicht über makroskopische Veränderungen bei BKD

	äußerliche Symptome		
	Abdomen	Auge	Haut
subakut/ akut	- Schwellung	- Exophthalmus (ein- oder beidseits) - Linsen- und Hornhauttrü- bung - Augenverlust	- Hämorrhagien (petechial bis flächig), oft an Flossenbasis - Bläschen - Ulzera
chronisch		- Augenverlust	

Fortsetzung Tabelle 2:

	innerliche Symptome		
	Muskulatur	Körperhöhle	Organe
subakut/ akut	- Blutungen	- Aszites - Blutungen	- Schwellung von Niere, Leber und Milz - grau-weiße Verfärbungen in Niere, Leber und Milz - Blutungen in Hoden und Eierstöcken
chronisch	- Abszesse - flüssigkeitsgefüllte Kavernen	- grauweiße Pseudomembranen auf inneren Organen - Trübung der Coelomflüssigkeit	- grauweiße Granulome variabler Größe, oft mit milchig-trüber Flüssigkeit gefüllt in Milz, Leber, Niere - granulomatöse Veränderungen in Hoden und Eierstöcken

Die in der Tabelle 2 genannten wichtigsten Veränderungen können in unterschiedlichen Kombinationen und Schweregraden auftreten.

Am häufigsten wird das Krankheitsgeschehen, wie bereits erwähnt, bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) beschrieben (siehe Anhang Tabelle 1).

Alle Autoren, außer MITCHUM und SHERMAN (1981), konnten äußerlich Veränderungen der Haut (petechiale bis flächige Blutungen, v.a. an den Flossenbasen, flüssigkeitsgefüllte Bläschen, Erosionen und Ulzera) feststellen. HOFFMANN et al. (1984) beobachteten bei frisch getöteten Fischen eine auffallende Blässe der Kiemen. BULLOCK et al. (1971), GHITTINO et al. (1977), MITCHUM und SHERMAN (1981), HOFFMANN et al. (1984), PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 a), SCHAUNER et al. (1985) beschreiben Augenveränderungen, die vom Exophthalmus (ein- oder beidseitig) über

Kornea- und Linsentrübung bis hin zum Verlust des Augapfels gehen. Die leere Augenhöhle enthält dann blutiges bis grau-weißes Granulationsgewebe. An innerlichen Krankheitszeichen stehen neben Blutungen und Abszessen in der Muskulatur (BULLOCK et al., 1971; EVELYN et al., 1973), Aszites, Peritonitis und Enteritis (FIJAN, 1977), die Veränderungen an Niere, Leber und Milz im Vordergrund. Leber und Milz sind im Anfangsstadium geschwollen, weisen kleine, grau-weiß bis gelbliche Bezirke auf, die sich zu granulomatösen und nekrotischen Herden weiterentwickeln können (BULLOCK et al., 1971; FIJAN, 1977; GHITTINO et al., 1977; HOFFMANN et al., 1984). An der Niere, dem besonders häufig betroffenen Organ, zeigen sich Schwellungen, grau-weiße Bezirke, Nekroseherde und im chronischen Stadium Granulome (bis zu 5 mm Durchmesser), die mit einem weißen, dickflüssigen Inhalt aus Bakterien, Leukozyten und Zelldetritus gefüllt sind (BULLOCK et al., 1971; FIJAN, 1977; GHITTINO et al., 1977; MITCHUM und SHERMAN, 1981; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b; SCHAUNER et al., 1985). BULLOCK et al. (1971) stellten an 15 % ihrer untersuchten, an BKD erkrankten Regenbogenforellen, Blutungen in Hoden und Eierstöcken fest. Was andere Forellen- und Saiblingsarten (Bachforelle - *Salmo trutta*, Nordamerikanische Seeforelle - *Salvelinus namaycush*, Bachsaibling - *Salvelinus fontinalis*) betrifft, so stimmen die Beschreibungen der pathologisch-anatomischen Symptome weitgehend mit denen der restlichen Salmoniden überein (SNIESZKO und GRIFFIN, 1955; EHLINGER, 1963; SMITH, 1964; FIJAN, 1977; MITCHUM und SHERMAN, 1981), wobei die Niere als hauptsächlich betroffenes Organ beschrieben wird. Als einzige konnten SNIESZKO und GRIFFIN (1955) beim Bachsaibling (*Salvelinus fontinalis*) neben Nieren- und Hautläsionen am futterleeren Magen-Darm-Trakt schwere Entzündungserscheinungen mit starker Schwellung der Analregion feststellen. Beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) beobachtete SMITH (1964) zwei wassertemperaturabhängige Bilder der BKD:

eine nekrotisierende Form (über 47 °F) und eine pseudomembranöse Form (unter 47 °F). Neben petechialen bis flächenhaften Blutungen in der Haut, in der Muskulatur und an der Schwimmblase stellte sie bei der "nekrotisierenden" Form grau-braune bzw. creme-weiße Läsionen und bläschenartige Bereiche in Leber, Niere und Milz fest. In diesen Veränderungen konnte sie bei mikroskopischer Betrachtung gram-positive Stäbchenbakterien nachweisen. Die "pseudomembranöse" Form beschrieb SMITH (1964) als chronisch mit weißen, pseudomembranösen, abziehbaren Belägen auf den inneren Organen und einer milchigen, bakterienhaltigen Flüssigkeit im Herzbeutel.

Bei den Pazifiklachsen (*Oncorhynchus*arten) wird das pathologisch-anatomische Bild vor allem für den Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) und den Königslachs (*Oncorhynchus tshawytscha*) geschildert; die Berichte stimmen in Bezug auf die wichtigsten äußerlichen (Haut, Auge) und innerlichen (Leber, Niere, Milz) Symptome überein (MACLEAN und YODER, 1967; VIGNEUILLE et al., 1977; HENDRICKS und LEEK, 1975; ALDRIN et al., 1978; KIMURA, 1978; IWAMA, 1980; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a). Sowohl bei Silber-, als auch bei Königslachsen stellten VIGNEUILLE et al. (1977) pseudomembranöse Beläge auf den inneren Organen fest. HENDRICKS und LEEK (1975) beschrieben einen Ausbruch der Krankheit bei Königslachsen (*O. tshawytscha*), der durch deutliches Überwiegen der Augendefekte im Verhältnis zu Nieren- und Milzveränderungen gekennzeichnet war. ELLIS et al. (1978) schilderten den Fall eines wildlebenden Königslachses (*O. tshawytscha*) aus dem Meer als typisches Beispiel von chronischer "Kidney Disease"; der Fisch war bis auf zahlreiche, weiße, granulomatöse Läsionen, die sich als bakterienhaltig herausstellten, ohne Besonderheiten.

Beim Buckellachs (Pink Salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*) stellte BELL (1961) sowohl kleine Bläschen und subkutane Schwellungen der Haut, als auch grau-weiße Läsionen und Nekrosen von Niere, Leber und Milz fest. Ähnliche Läsionen traten auch am Herzen

auf; auf Herz und Milz lagen durchscheinende Pseudomembranen.

2.4.2. Mikroskopisch (histologisch und elektronenoptisch)

Allgemein zeigt sich bei BKD-kranken Salmoniden nach KLONTZ (1982), SNIESZKO und GRIFFIN (1955) und SCHÄPERCLAUS (1979) folgendes histologische Bild einer chronischen, systemischen, diffus-granulomatösen (histiozytären) Entzündung (WOLKE, 1975). Die makroskopisch sichtbaren Abszesse und Knötchen sind Granulome, die zahlreiche Entzündungszellen, Riesenzellen und intra- wie extrazellulär vorkommende Bakterien und Zelldetritus aufweisen. Die Nierenglomerula und -tubuli sind in einer Art und Weise verändert, die der bei einer Glomerulonephritis bzw. beim Nephrotischen Syndrom der Säugetiere ähnelt. Das retrobulbäre Gewebe enthält viele Entzündungszellen und die Augenmuskeln sind weitgehend degeneriert oder völlig zerstört. Bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) beschrieben HOFFMANN et al. (1984) und PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 b) am Herzen eine nicht-eitrig, chronische, herdförmige Myokarditis; das retrobulbäre Gewebe zeigte bei Augenverlust ebenso eine chronische Entzündung mit Granulationsgewebe, das von Leukozyten und Makrophagen infiltriert war. Bakterien kamen entweder extra- oder intrazellulär vor. Die Niere wies teilweise große Herde käsiger Nekrose und diffuse, interstitielle Granulome mit z.T. verkäsendem Inhalt auf. Zudem waren die Nierentubuli dilatiert und mit amorphem Material gefüllt. Das hämopoetische Gewebe der Niere war oft herdförmig aufgelockert und die Pigmentmakrophagen waren deutlich vermehrt.

SMITH (1964) stellte beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) in Milz und Leber herdförmige Nekrosen fest, die mit Zelldetritus gefüllt waren und peripher zahlreiche grampositive Bakterien enthielten; auch die Niere wies um die Tubuli viele grampositive Bakterien und nekrotische Bereiche auf. Die Pseudomembranen beschrieb SMITH (1964) als auf der Organkapsel liegende,

dünne Fibrinschicht, die viele Leukozyten enthielt. Sie wies bis zu drei Schichten auf, wovon die äußerste Fibrin, kernhaltige Zellen, gram-positive Bakterien und die innerste viele Fibroblasten und Histiozyten enthielt. Die Bakterielle Nierenerkrankung stellt sich bei Königslachsen (*Oncorhynchus tshawytscha*), Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) und Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) im histologischen Bild (WOOD und YASUTAKE, 1956; HENDRICKS und LEEK, 1975) folgendermaßen dar:

In Niere, Leber und Milz wurde das ursprüngliche Gewebe von Granulomen verdrängt, wobei in der Niere vor allem das hämopoetische Gewebe betroffen war. In der Leber fanden sich die granulomatösen Knoten im Bindegewebe zwischen den Leberparenchymzellen. Diese wiederum enthielten vor allem in Nekrosebereichen zytoplasmatische Einschlusskörperchen. Das Pankreas wies in den Azinuszellen ebenso solche Einschlüsse auf. Der Herzmuskel war durch eine massive Myokarditis schwer geschädigt. Entzündungserscheinungen ließen sich sowohl in den Kiemen, dem Magen-Darm-Trakt (erhöhte Zahl eosinophile Granulozyten in der Muskelschicht und Peritonitis), als auch in der Skelettmuskulatur feststellen. Die granulomatös-nekrotischen Herde fanden sich auch in den Meningen, dem Gehirn, der Gallenblase und in der Schwimmblase. Gram-positive Bakterien finden sich sowohl intra- (nach Phagozytose durch Entzündungszellen und Nierenzellen) als auch extrazellulär (in Granulomen, Muskel- und Mukosaschicht des Magen-Darm-Traktes). In Leber und Pankreas standen die Bakterien in einem engen räumlichen Zusammenhang mit den beschriebenen Einschlusskörperchen.

Elektronenmikroskopisch wies YAMAMOTO (1975) bei BKD-kranken Regenbogenforellen und Bachsaiblingen (*Salmo gairdneri* und *Salvelinus fontinalis*) in den Nierenzellen Bakterien nach, wobei er die Aufnahme der Bakterien durch Phagozytose und eine intrazelluläre Vermehrung mutmaßte.

Genauere elektronenoptische Untersuchungen stellten YOUNG und

CHAPMAN (1978) bei Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) an. Es wurden Leber, Milz und Niere von künstlich wie natürlich infizierten Fischen untersucht. Die Bakterienzellen selbst ($0,3-0,5 \times 0,6-1,0 \mu\text{m}$) waren zentral hell gefärbt und enthielten filamentöses Material, das der DNS entspricht. Peripher enthielten sie kleine elektronenoptisch dichte Partikel, die nach Größe und Dichte Ribosomen sein könnten. Bei Zellteilungen wurde eine transversale Wand beobachtet. In Makrophagen waren die Bakterien von einer Membran umgeben; extrazellulär im Wirtsgewebe zeigten sie unregelmäßige Form (z.B. Schwellung eines Endes), was auf den "coryneformen" Charakter des Bakteriums hinwies. Aufgrund der experimentellen Infektion war es YOUNG und CHAPMAN (1978) möglich den chronologischen Ablauf der Organveränderungen zu verfolgen. Anfangs konnten in der Niere spärliche, elektronendichte, subendotheliale Ablagerungen beobachtet werden. Die Tubuli waren hydrophisch verändert (geschwollene Mitochondrien, erweitertes Endoplasmatisches Retikulum); ferner enthielt das Zytoplasma im gesamten Tubulusepithelzellbereich fettähnliche Tröpfchen. Im späteren Verlauf vermehrten sich in den Glomerula mesangiale und subepitheliale Ablagerungen, die elektronendicht und von granulärer Struktur waren. Die mesangiale Matrix war proliferiert. Fettähnliche Tröpfchen befanden sich sowohl in den Glomerulaendothelzellen als auch in den viszeralen und parietalen Epithelzellen. Die Endothelschicht der Kapillarschlingen wurde lückenhaft, die Basalmembran geringgradig verdickt und gesprenkelt. Diese veränderten Glomerula waren in künstlich wie natürlich infizierten Fischen zu finden. Die Tubuli waren terminal irreversibel geschädigt: geplatzte Mitochondrien, Lysosomen- und Zellkernstrukturveränderungen, Unterbrechungen des Bürstensaumes und der Basalmembran des Plasmalemmes waren sichtbar. In proximalen und distalen Tubuluszellen lagerte sich Kollagen am Basalsaum ab; in unmittelbarer Nähe befanden sich sternförmige Zellen, ähnlich Fibroblasten mit gut entwickeltem, granuliertem Endo-

plasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat. In den zahlreich auftretenden polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen und Pigmentzellen mit phagozytierten, intrazellulären Bakterien spiegelte sich bei der Krankheit die Entzündung und die Immunreaktion wieder. Die intrazellulären Bakterien blieben morphologisch völlig intakt und zeigten auch aktive Zellteilung, was auf ihr Weiterleben in der Zelle hinwies. Dieses elektronenoptische Bild ähnelt nach YOUNG und CHAPMAN (1978) sehr stark den Nierenveränderungen der Säugetiere beim Vorliegen einer Proteinurie, eines Nephrotischen Syndroms bzw. einer Glomerulonephritis.

2.5. Pathogenese und Epizootologie

Die Pathogenese einer systemischen, d.h. allgemeinen Infektionskrankheit umfaßt die Infektion (Haften und Vermehrung des Erregers an der Eintrittspforte), die Inkubationszeit (Zeit von Infektion bis Krankheitsausbruch) und die Ausbreitung des Erregers im Organismus, die Organmanifestation und die möglichen Spätstadien. Dabei spielen Virulenz des Erregers, innere (z.B. Ernährung, Abwehr des Wirtes) und äußere Faktoren (z.B. Transportstress, Temperatur) eine wichtige Rolle. Die Abwehr des Wirtes kann entweder durch Resistenz, also unspezifischer, ererbter, allgemeiner Unempfänglichkeit (z.B. Phagozytose und humorale Komponenten wie Lysin oder Komplement), oder durch Immunität erfolgen; letztere ist die aktiv oder passiv erworbene Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen, die entweder auf zellulärer oder humoraler Grundlage erfolgt. Die Epizootologie umfaßt die Ursachen und die Verbreitung einer Infektionskrankheit bei Tieren. Dabei spielen die Erregerausscheidung, die möglichen Eintrittspforte, Infektketten (homonome: Fisch - Fisch, heteronome: Fisch - belebter oder unbelebter Vektor), das Erregerreservoir und Faktoren, wie Jahreszeit, Umweltbedingungen, Disposition des Wirtes etc. eine entscheidende Rolle (ROLLE und MAYR, 1985).

Die Bakterielle Nierenerkrankung (BKD) stellt eine systemische Infektionskrankheit dar. Der Erreger ("*Corynebacterium salmoninus*", "*Renibacterium salmoninarum*") ist für Salmoniden pathogen, hat aber nach WOOD und YASUTAKE (1956) aufgrund des häufig chronischen Verlaufs eine geringe Virulenz.

Über die Inkubationszeit der Krankheit gibt es im Infektionsversuch sehr divergierende Angaben; sie hängt von vielen verschiedenen Voraussetzungen, wie z.B. Wassertemperatur, Injektions- bzw. Aufnahmedosis, Infektionsmodus, Abwehrlage und Empfänglichkeit der Fischart ab. So finden sich für Silberlachse (*Oncorhynchus kisutch*), die i.p. mit BKD infiziert wurden bei IWAMA (1980) 17 - 31 Tage Inkubationszeit bei 13 - 14 °C Wassertemperatur, bei SANDERS et al.(1978) 21 - 34 Tage bei 15,0 - 20,0 °C, ansteigend auf 60 - 71 Tagen bei 6,7 °C. IWAMA und GREER (1980) gelang es von einem klinisch kranken Königslachs (*O. tshawytscha*) BKD auf Silberlachse (*O. kisutch*) zu übertragen, die im nachgeschalteten Aquarium demselben Wasser ausgesetzt waren. 28 Tage nach Exposition setzten Krankheitssymptome bei den Silberlachsen ein. KIMURA (1978) stellt für Silberlachse temperaturabhängige Inkubationszeiten von 23 Tagen bei 20,5°C aufsteigend bis 81 Tagen bei 3,9 °C fest. Injektionsversuche an Sockeye-Lachsen (*O. nerka*) laut IWAMA (1980) erbrachten 22 - 36 Tage bei 13 - 14 °C und nach SANDERS et al. (1978) etwa 21 - 34 Tage bei 15,0 - 20,5 °C. Für den Atlantischen Lachs (*S. salar*) wies SMITH (1964) 5 - 62 Tage (im Durchschnitt 22 Tage) post infectionem nach. Bei Regenbogenforellen (*S. gairdneri*) geben WOLF und DUNBAR (1959 b) 48 Tage (durch künstliche Verletzung der Haut und Bakterienexposition), SANDERS et al.(1978) im Schnitt 21 - 34 Tage bei 15,0 - 20,5 °C an. Bachsaiblinge (*Salvelinus fontinalis*) erkrankten nach 31 - 41 Tagen (YOUNG und CHAPMAN, 1978).

Nach MUNRO (1982) kommen beim Fisch als Eintrittspforten für pathogene Bakterien die Oberhaut, Kiemen und Auge, sowie die innerliche epitheliale Auskleidung (z.B. Gallenblase, Ductus

pneumaticus, Abdominalporen in die Körperhöhlen) in Frage. Die Oberhaut ist aber durch antikörperhaltige Schleimabsonderung gegen äußere Einwirkung geschützt. Die Kiemen sind ebenfalls durch eine Schleimschicht geschützt. Einige Autoren (SNIESZKO und GRIFFIN, 1955; WOOD und YASUTAKE, 1956; ALLISON, 1958; WOLF und DUNBAR, 1959 b; WARREN, 1963; BULLOCK et al., 1971; BULLOCK et al., 1975) weisen auf Parasiten (Trematoden, Copepoden, enzystierte Metazerkarien) als mögliche Vektoren der BKD hin, die das Bakterium durch an Haut und Kiemen gesetzte Läsionen übertragen könnten. Es lassen sich aber in der Literatur keine Belege für diese Theorie finden. Die Infektion über künstlich gesetzte Hautläsionen mit anschließendem Bad in einer Bakteriensuspension führte bei Bachsaiblingen (*S. fontinalis*) nach 48 Tagen zum Ausbruch der Krankheit (WOLF und DUNBAR, 1959). BULLOCK et al. (1971) konnten dies bei Regenbogenforellen ebenso nachvollziehen. Obwohl die Epithelschicht des Magen-Darm-Traktes durch Leukozyten und antikörperhaltige Interzellularflüssigkeit geschützt ist (MUNRO, 1982), war die Übertragung der BKD durch kontaminiertes Futter (Organe infizierter Fische) möglich: WOOD und WALLIS (1955) bei Königslachsen (*O. tshawytscha*), HOFFMANN et al., (1984) bei Regenbogenforellen (*S. gairdneri*) berichten darüber. SNIESZKO und GRIFFIN (1955) sowie WOLF und DUNBAR (1959) konnten beim Bachsaibling (*S. fontinalis*) kein Angehen einer peroralen Infektion beobachten.

Die Organe, die durch die Krankheit verändert werden, sind oben genannt (siehe II.2.4.1.-2.4.2.). Nach WOOD und YASUTAKE (1956) sind das hämopoetische Gewebe der Niere und der Magen-Darm-Trakt die ersten Stufen der Organmanifestation. Pankreas, Leber, Milz und Serosen der Körperhöhle werden ebenfalls befallen. Im Spätstadium sind Herz, Kiemen, Meningen, Gehirn, Gallenblase, Schwimmblase, Auge und Muskulatur betroffen (WOOD und YASUTAKE, 1956). HENDRICKS und LEEK (1975) halten es für möglich, daß das Auge eine Eintrittspforte für das Bakterium ist.

"Renibacterium salmoninarum" kommt extra- und intrazellulär vor. WOOD und YASUTAKE (1956), YAMAMOTO (1975) und YOUNG und CHAPMAN (1978) konnten es sowohl in Makrophagen, als auch in Organparenchymzellen nachweisen.

Der chronische Verlauf der BKD ist laut MUNRO (1982) der Mykobakteriose vergleichbar und mit Riesenzellbildung, intrazellulärer Anwesenheit und Überleben des Erregers, sowie Bildung von diffusen Granulomen verbunden. Weitreichende Zell- und Gewebeschäden der Organe lassen eine Toxinbildung vermuten. Bisher konnte für das "Renibacterium salmoninarum" aber weder eine Exo- noch Endotoxinbildung nachgewiesen werden.

Der hohe Prozentsatz von 30 - 37 % an subklinischen Fällen, d.h. an "Carrier"-Fischen, (Paterson et al. 1979; LALLIER et al. 1981) zeigt, daß es sich bei der BKD um eine persistierende Infektionskrankheit handelt. Die Orte der Persistenz des Erregers sind intrazellulär nachgewiesen (siehe oben). Nach MUNRO (1982) wäre auch ein Verbleiben auf Gewebeoberflächen, z.B. auf Darmepithel oder Niere denkbar. Durch solche Bakteriendaueraus-scheider (z.B. über Fäzes und Urin) ist eine horizontale Infektion auf andere Wirte möglich; ebenso ist eine vertikale Übertragung nachgewiesen (EVELYN, 1984).

In der Literatur werden zahlreiche Faktoren diskutiert, die das Angehen der Infektion und ihr klinisches Aufflackern im Falle des persistierenden Stadiums zur Folge haben. Sie können in äußere und innere Faktoren eingeteilt werden. Zu den letzteren gehört die Beeinträchtigung der Abwehr des Fisches durch eine virale Primärinfektion (YAMAMOTO, 1975) oder Parasiten, wie z.B. enzystierte Metazerkarien (WOOD und YASUTAKE, 1956). Ferner konnte eine transferrin-genotypabhängige Widerstandskraft von Pazifiklachsen festgestellt werden (SUZUMOTO et al. 1977; WINTER et al. 1980; KLONTZ, 1982), wobei über eine Erhöhung des eisenbindenden Proteins Transferrin im Blut des Fisches den Bakterien das essentielle Eisen nicht mehr ausreichend zur Verfügung steht.

Ferner ist die Empfänglichkeit für die Krankheit bei Silberlachsen (*O.kisutch*) und Regenbogenforellen (*S.gairdneri*) am geringsten (SANDERS et al., 1978). BULLOCK et al.(1971), MITCHUM und SHERMAN (1979) und SCHÄPERCLAUS (1979) stufen die Bachforelle (*S.trutta*) und den Bachsaibling (*Salv.fontinalis*) als besonders anfällig ein; dabei handelt es sich um empirische Daten. Über genaue Mechanismen dieses Phänomens ist nichts bekannt. Eine Erhöhung des Cortisolspiegels im Blut bei Stress durch Umsetzen, Transport (WARREN, 1963 a) und zu hohe Besatzdichte (WEDEMEYER, 1976) führen über einen abwehrdepressiven Effekt zum Krankheitsausbruch.

An äußeren Faktoren sind die Wassertemperatur, die Wasserqualität (Härte, Sauerstoffgehalt, Verschmutzung, Salzgehalt), die Futterzusammensetzung und die Haltungsbedingungen (Besatzdichte, häufiges Umsetzen, Transport) zu nennen. Allgemein fördern Änderungen der Wassertemperatur den Krankheitsausbruch (BELDING und MERRILL, 1935; RUCKER et al., 1953; WOLF und DUNBAR, 1959 b; SMITH, 1964; BULLOCK et al., 1971; MITCHUM und SHERMAN, 1979; LALLIER et al., 1981; KLONTZ, 1982). Bei Silberlachsen (*O. kisutch*) und Regenbogenforellen (*S.gairdneri*) tritt in Infektionsversuchen (SANDERS et al., 1978; FRYER und SANDERS, 1981) die größte Ausfallsrate bei 6,7-12,2 °C auf. Über 12,2 °C nimmt sie ab, und zwar bis zu 8-14 % bei 20,5 °C. EARP et al. (1953) konnten bei BKD-Ausbrüchen in Königs- und Sockeye-Lachsbeständen Temperaturen von 12,8-18,3 °C bzw. 8,3-10,6 °C messen. Sockeye-Lachse sind von 6,7-20,5 °C sehr anfällig (SANDERS et al., 1978; FRYER und SANDERS, 1981). Ein Abnehmen der Ausfälle wird bis 3,9 °C beobachtet (EARP et al., 1953; WOOD, 1974; KIMURA, 1978). Temperaturen über 17,8-20,5 °C haben laut SANDERS et al. (1978) einen suppressiven Effekt auf den Krankheitsverlauf. Was die Wasserqualität betrifft, so konnten WOLF und DUNBAR (1959), WARREN (1963 a), MITCHUM und SHERMAN (1979), SNIESZKO (1980) und KLONTZ (1982) einen Zusammenhang zwischen der Wasserhärte und der Krankheitshäufigkeit herstellen.

In "hartem" Wasser, d.h. mit einer Gesamthärte über 100 mg/l (10 mg Calciumoxid/l entspricht 1°dH) tritt BKD häufiger auf als im "weichen" Wasser, d.h. unter 100 mg/l Gesamthärte. FRYER und SANDERS (1981) beobachteten im Versuch bei salzwassergehälterten, BKD-infizierten Salmoniden höhere Mortalitätsraten als im Süßwasser. Niedriger Sauerstoffgehalt und erhöhter Ammoniakspiegel durch erhöhte Besatzdichte begünstigen laut WEDEMEYER (1976) den Ausbruch der Krankheit.

Futterzusammensetzung und -qualität üben ebenso Einfluß auf den Krankheitsausbruch und -verlauf aus. So fördert Trocken- statt Naßfütterung die Bakterielle Nierenerkrankung (WOOD, 1974).

WOODALL und LAROCHE (1974), KLONTZ (1982), PATERSON et al. (1983) konnten bei jodreicher (10,1 µg/g) Fütterung einen positiven Effekt auf die Krankheit verbuchen. PATERSON et al. (1983) senkten BKD-Ausfälle durch calciumarme, spurenelementreiche Fütterung. WEDEMEYER und ROSS (1973) stellten fest, daß sich die Futterzusammensetzung auf den chronischen Verlauf der BKD auswirkt, nicht aber auf das Infektionsgeschehen selbst.

Über die Erregerausscheidung ist noch wenig bekannt (MITCHUM et al., 1979; MITCHUM und SHERMAN, 1981; EVELYN et al., 1981; PATERSON et al., 1981). Lediglich in den Fäzes konnte das Bakterium nachgewiesen werden (BULLOCK et al., 1980).

Zu den Infektketten heteronomer Art gibt es, wie oben bereits gesagt, weder Belege dafür, daß belebte Vektoren (Parasiten) die Krankheit übertragen, noch ist vollständig geklärt, welche unbelebte Vektoren (Fäzes, Urin, Schlamm, Wasser) letztendlich für die horizontale Krankheitsausbreitung verantwortlich zu machen sind (MITCHUM et al., 1979; MUNRO, 1982). Ferner ist eine vertikale Übertragung vom Fisch auf seine Nachkommen erwiesen (EVELYN et al., 1984). Mehrere Autoren vermuteten eine Weitergabe der BKD in den Eiern auf die Fischbrut und damit verbunden eine geographische Verbreitung (ALLISON, 1958; WOLF, 1958; GHITTINO et al., 1972; SNIESZKO, 1980; KLONTZ, 1982; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b; SCHAUNER et al., 1985).

An Königslachs- und Regenbogenforelleneiern aus einer Fischzucht mit BKD-Vorgeschichte stellten BULLOCK et al. (1978) trotz äußerlicher Joddesinfektion der Eier an der geschlüpften Brut in Niere und Magen-Darm-Trakt fluoreszenzserologisch "*Renibacterium salmoniarum*" fest. Bei 2-4 Monate alten Fischen traten Ausbrüche von klinischer BKD auf. Durch Joddesinfektion der Eier konnte die BKD-Befallsrate deutlich gesenkt werden. Ähnliche Verbesserungen der Krankheitssituation erzielten JENSEN et al. (1981) durch Erythromycinphosphatbehandlung der Eier. EVELYN et al. (1984) stellte bei Versuchen zur Oberflächendesinfektion eine Rate von 38,5 % völlig oberflächensterilen Eiern fest. 5,8 % der Eier enthielten intrazellulär jedoch noch Bakterien, d.h. daß durch Eidesinfektion die Krankheit zwar nicht ausgerottet wird, aber der Infektionsdruck merklich gesenkt werden kann.

Als wichtiges Glied in der horizontalen Infektkette von Fisch zu Fisch und als Erregerreservoir werden die sogenannten "Carrier" beurteilt; Fische, die das Bakterium beherbergen und womöglich ausscheiden, aber dabei nicht klinisch krank sind (SNIESZKO und GRIFFIN, 1955; EVELYN et al., 1973; FRANTSI et al., 1975; MITCHUM et al., 1979; SCHÄPERCLAUS, 1979; SNIESZKO, 1980; FRYER und SANDERS, 1981; LALLIER et al., 1981; MITCHUM und SHERMAN, 1981; KLONTZ, 1982; HOFFMANN et al., 1984). Es ist an eine Ansteckung von Wildfischen durch Tiere aus einer Fischzucht wie vice versa zu denken. Auch während der Meerwasserphase des Lebenszyklus anadromer Fische ist das Überdauern der Bakterien erwiesen (ELLIS et al., 1978). Die Angaben zum Prozentsatz der subklinischen Fälle bewegen sich von 10 - 37,5 % des Untersuchungsmaterials aus Fischzuchten sowie aus freiem Süß- und Salzwasser (PATERSON et al., 1979; LALLIER et al., 1981).

Durch Therapie der Fischbestände mit Antibiotika und Chemotherapeutika (RUCKER et al., 1953; SNIESZKO und GRIFFIN, 1955;

ALLISON, 1958; DECEW, 1979) kann das klinische Erscheinungsbild der Krankheit und die Mortalitätsrate zwar reduziert werden, allerdings führt dies nicht zur vollständigen Ausrottung des Bakteriums; vielmehr persistiert die Infektion. Besondere Bedeutung wird im Rahmen der Seuchenhygiene deshalb der Entdeckung von "Carriern" beigemessen. Die angewandten Untersuchungstechniken reichen vom kulturellen Nachweis des Erregers, über immunfluoreszenzserologische Methoden (direkte und indirekte Immunfluoreszenz), bis hin zum Nachweis von Antikörpern im Fisch durch Agglutination (BULLOCK und STUCKEY, 1975; WEBER und ZWICKER, 1979; BULLOCK et al., 1980; LAIDLER, 1980; EVELYN et al., 1981; LALLIER et al., 1981; KLONTZ, 1982; PATERSON et al., 1983).

3. Diagnose

Für den Nachweis der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) gibt es zahlreiche diagnostische Verfahren.

Das pathologisch-anatomische Bild wurde bereits besprochen (siehe II.2.4.1.2.4.2.). Im folgenden werden in der BKD-Diagnostik gängige Labormethoden dargestellt.

3.1. Bakteriennachweis

3.1.1. Bakterienfärbung im Organabklatsch oder Schnittpräparat

Die BKD-Diagnose beruhte neben Sektionsbild, Histologie und der Anzucht des Erregers vor allen Dingen auf dem Nachweis grampositiver Stäbchen bzw. Diplokokken im Abklatschpräparat von verändertem Gewebe (BELDING und MERRILL, 1935; EARP et al., 1953; RUCKER et al., 1953; SNIESZKO und GRIFFIN, 1955; BELL, 1961; HUNN, 1964; SMITH, 1964; MACLEAN und YODER, 1967; PIPPY, 1969). Diese schnell und einfach durchführbare Methode wurde lange beibehalten (EVELYN et al., 1973; GHITTINO, 1977; ELLIS et al., 1978; IWAMA und GREER, 1980; EVELYN et al., 1973; FRYER und SANDERS, 1981).

Nach SCHÄPERCLAUS (1979) ist jedoch die Gramfärbung bei geringer Bakterienzahl als unsicher anzusehen. So stellten BULLOCK et al. (1980) fest, daß für eine optimale Auswertung mindestens 10^6 - 10^7 Bakterien pro Abklatsch vorliegen müssen. Im Vergleich mit anderen Nachweisverfahren (Indirekte Immunofluoreszenz, Coagglutination, Immunodiffusion) stellte sich die Gramfärbung meist als weniger empfindlich heraus (KIMURA et al., 1978; PATERSON et al., 1979; BULLOCK et al., 1980; LAIDLER, 1980; KIMURA und YOSHIMIZU, 1981 a,b; LALLIER et al., 1981). Jedoch eignet sie sich dazu, in kürzester Zeit am Organabklatsch eine Verdachtsdiagnose zu erhalten (KLONTZ, 1982). Die direkte Bakterienfärbung ist auch am histologischen Schnittpräparat möglich; sie ist aber keine gängige Methode. BRUNO und MUNRO (1982) färbten Gewebeschnitte mit Lillie's Allochrome-Technik (CULLING, 1974), bei der neben den Bakterien auch Kollagen, Fibrin, Amyloid und Muskelretikulum differenzierbar sind. WOOD und YASUTAKE (1956) färbten mit einer modifizierten Wolbach's-Giemsa-Technik (LILLIE, 1948) intra- wie extrazelluläre BKD-Bakterien im histologischen Präparat rötlich-purpur an. Als modifizierte Gramfärbungsarten, die ebenso an histologischen Präparaten verwendet wurden, ist die Methode nach TAYLOR (1966) zu nennen (YOUNG und CHAPMAN, 1978); ferner die Gramfärbung nach BROWN und HOPPS (1973), die von HENDRICKS und LEEK (1975) angewandt wurde. PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 b) färbten mit der Methode nach Braun-Brenn gram-positive Stäbchen an.

3.1.2. Anzucht des Erregers

Bei der Entwicklung geeigneter Kulturmethoden waren der Cystein- und Serum- bzw. Blutbedarf des Bakteriums und sein Temperaturoptimum bei 15-18 °C entscheidend (KLONTZ, 1982). Nachdem BELDING und MERRILL (1935) eine Anzucht des "Renibacterium salmoninarum" mit den damals üblichen Nährböden und

Standardbedingungen nicht gelang, erprobten ORDAL und EARP (1953) eine Reihe von Nährböden (z.B. zerkleinertes Hühnerembryogewebe in 10 % Agar, Fleischaufguß in Agar, Dorset's Eiermedium); schließlich erzielten sie mit einem Cystein-Blut-Agar und einem cysteinangereicherten Dorset-Medium bei 17 °C in 7-10 Tagen bzw. 3 - 4 Wochen akzeptable Ergebnisse bei der Isolierung des Bakteriums aus der Fischniere (ORDAL und EARP, 1956). WOLF und DUNBAR (1959 b) erprobten erfolgreich ein Mueller-Hinton-Medium, dem sie 0,1 % L-Cystein-hydrochlorid zugesetzt hatten. Dieses modifizierte Mueller-Hinton-Medium wurde sowohl zur Kultivierung von Bakterienstämmen als auch zur Anzucht aus Organmaterial erkrankter Fische verwendet (EHLINGER, 1963; BULLOCK und STUCKEY, 1975; GHIITTINO et al., 1977; SUZUMOTO et al., 1977; ELLIS et al., 1978; AUSTIN und RODGERS, 1980; BRUNO und MUNRO, 1982). Bei Temperaturen von 15-18 °C konnten nach 13 - 16 Tagen kleine, glattrandige, runde, cremeweiß bis gelbliche, mattglänzende, schleimige Kolonien beobachtet werden. Auf dem Cystein- Blut-Agar nach ORDAL und EARP (1956) waren bei 15-18 °C nach 14 Tagen weiße, runde, erhabene, glänzende Kolonien von variabler Größe und elastischer Konsistenz zu sehen. Dieser Nährboden wurde von einer Reihe Autoren verwendet, um Bakterienstämme zu kultivieren und den Erreger zu isolieren (SMITH, 1964; DECEW, 1972; ROBERTS, 1978; SANDERS et al., 1978; SCHÄPERCLAUS, 1979; SANDERS und FRYER, 1980). EMBLEY et al. (1982) ersetzten in ihrem "Semi-defined growth medium for Renibacterium salmoninarum" (Semi-defined-Medium) das Serum bzw. Blut durch andere Komponenten, die den Wachstumsansprüchen des Bakteriums gerecht werden. Der Nährboden enthielt neben Trypton, Mineralsalzen, stickstoffhaltigen Komponenten und Agar noch eine Reihe steriler Lösungen (Puffer, Glukose, Cystein, Vitamine). Bei 15 °C zeigte das Bakterium nach 10 Tagen maximales Wachstum. Als Vorteil gegenüber den serumhaltigen Medien wurden die geringen Herstellungskosten angeführt; allerdings eignete es sich nur schlecht für die Isolierung des Erregers aus dem Fisch (SMITH, 1964).

Auf der Basis des Cystein-Blut-Agars nach ORDAL und EARP (1956), auch KDM-1 ("Kidney disease medium 1") genannt, entwickelte EVELYN (1977) den KDM-2-Nährboden ("Kidney disease medium 2"). Dieses Medium enthält Pepton (1 %), Hefeextrakt (0,05 %), Cystein-hydrochlorid (0,1 %), Agar (1,5 %) und Serum (foetales Kälberserum, 20 %) und erzielt, auf pH 6,5 eingestellt, bei 15 °C erheblich bessere Bakteriumswachstumsraten als KDM-1 und modifizierter Mueller-Hinton-Agar (WOLF und DUNBAR, 1959 b). Isolierung des Bakteriums aus Organmaterial wird empfohlen, Verdünnungen des homogenisierten Gewebes auf den Nährboden aufzutropfen. Nach 4-10 Tagen (maximal 3-4 Wochen) sind bei der Anzucht bereits Kolonien sichtbar, die cremeweiß bis gelblich, rund, erhaben, glattrandig, mattglänzend und von schleimiger Konsistenz sind (EVELYN et al., 1973). Um bessere Ergebnisse bei der Isolierung des "Renibacterium salmoninarum" zu erzielen, empfehlen EVELYN et al. (1981) 50 % des gesamten Nierengewebes zu homogenisieren und nach dreimaligem Waschen und Zentrifugieren in Peptonwasser (0,1 % Pepton, 0,85 % NaCl), wobei enzymartige anti-bakterielle Faktoren aus dem Nierengewebe entfernt werden, in Verdünnung (Peptonwasser) auf den Nährboden aufzutropfen. Das Organmaterial sollte frisch und steril gewonnen werden; aber selbst nach 75 Tagen Lagerung bei - 90 °C ergaben sich noch unvermindert gute Anzuchtergebnisse. Mittlerweile wird das KD-Medium-2 als einer der gebräuchlichsten Nährböden in der BKD-Diagnostik verwandt: BULLOCK et al. (1974), ALDRIN et al. (1978), PATERSON et al. (1979), MITCHUM et al. (1979), IWAMA (1980), LAIDLER (1980), EVELYN et al. (1981), FRYER und SANDERS (1981), EMBLEY et al. (1982), KLONTZ (1982), KUSSER und FIEDLER (1983), PATERSON et al. (1983), EVELYN et al. (1984), PFEIL-PUTZIEN et al. (1985 a,b). Um das Überwuchern der langsam wachsenden BKD-Erreger durch andere Keime zu verhindern, setzten AUSTIN et al. (1983) einer cystein- und serumhaltigen Nährbodengrundlage noch Antibiotika (Cycloheximide, 0,005 %; D-Cycloserin, 0,00125 %; Polymyxin-B-

Sulfat, 0,0025 %; Oxolinsäure, 0,00025 %) zu, für die "Renibacterium salmoninarum" unempfindlich ist; dadurch werden aber andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum gehemmt. Nach 10 Tagen sind auf dem SKDM-Nährboden ("Selective kidney disease medium") bei 15 °C bereits kleine Kolonien sichtbar. Die Anzahl der Bakterienisolate aus Fischen konnte durch dieses Kulturmedium (AUSTIN et al., 1983) merklich erhöht werden.

3.1.3. Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony

Die Immunodiffusion nach Ouchterlony (OUCHTERLONY, 1958 und 1962) ist eine Präzipitationsreaktion, die im halbfesten Medium durchgeführt wird. Bei der zweidimensionalen Doppelimmunodiffusion (DID) diffundieren Antigen und Antikörper (Serum) in einem Gelmedium von getrennten Depots gegeneinander. Am Ort des Zusammentreffens reagieren Antigen und Antikörper miteinander, es entstehen Immupräzipitate, die aufgrund ihres Molekulargewichtes nicht mehr weiterwandern und als Präzipitationslinien sichtbar bleiben.

Bei einheitlichem Antigen-Antikörpersystem handelt es sich laut MAYR et al. (1977 b) um einfache Linien. Multiple gespaltene Linienbildung zeigt an, daß das Antigen nicht homogen ist und Moleküle verschiedenen Molekulargewichtes enthält, die verschieden schnell wandern. Davon ist die Bildung nicht vollständig gespaltener Linien (sichelförmig) abzugrenzen, die konzentrationsbedingt auftritt. Bei gleichen Konzentrationen von Antigen und Antikörper liegt die Präzipitationslinie genau in der Mitte zwischen den Depots. Bei Konzentrationsunterschieden liegt die Linie näher am schwächer konzentrierten Reagenten. Sie bietet ein gebogenes und am Scheitel verbreitertes Bild, wobei die konkave Seite der Komponente mit dem größeren Molekulargewicht zugewandt liegt.

Bei der Makromethode der DID wird flüssiges Gelmedium (0,8-1,5 % Noble-Agar in Puffer gelöst, Zusatz von 0,01 % Merthiolat) in

Petrischalen gefüllt, so daß eine 2-3 mm dicke Schicht entsteht. Nach dem Erstarren des Agars werden ein zentrales und sechs periphere Löcher (Durchmesser 3-5 mm, Abstand maximal 5 mm) eingestantzt. Diese Depots werden dann mit den Reaktionskomponenten beschickt und in einer feuchten Kammer bei entsprechend erforderlicher Reaktionstemperatur inkubiert.

Die Mikromethode wird nach demselben Prinzip durchgeführt (OUCHTERLONY und NILSSON, 1973; MAYR et al., 1977 b). Es werden allerdings geringere Mengen Antigen und Antikörper benötigt, da die Reaktion auf gelbeschichteten Objektträgern mit kleinem Lochdurchmesser (3 mm) und -abstand (3 mm) erfolgt.

BULLOCK et al. (1974) und CHEN et al. (1974) führten diesen Test zum Nachweis von BKD-Bakterien in Organmaterial in Form der Makromethode durch. Als Agarmedium benützten sie 1 % Noble Agar (Difco) in physiologischer NaCl-Lösung mit Zusatz von 0,01 % Merthiolate. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur (20-25 °C) in einer feuchten Kammer und konnte nach 1-4 Tagen abgelesen werden. In diesem System wurden Suspensionen von unbehandelten bzw. ultraschall-behandelten Bakterien, sowie homogenisiertes Organmaterial (Leber, Niere, Milz, Herz, Blut) aus BKD-infizierten Fischen gegen aus Kaninchen gewonnene Anti-KD-Seren getestet. Verschiedene Stämme bzw. Isolate des "Renibacterium salmoninarum" verhielten sich serologisch identisch. Mit Material aus gesunden Fischen und für Fischen apathogenen, grampositiven Bakterien ergaben sich keine Kreuzreaktionen. Die Doppelimmunodiffusion ist somit laut CHEN et al. (1974) eine schnelle und spezifische Nachweismethode für die BKD (siehe auch SCHÄPERCLAUS, 1979; FRYER und SANDERS, 1981; KLONTZ, 1982)

KIMURA (1978) untersuchte mit der Doppelimmunodiffusionsmethode (DID) 4 Kaninchen-Anti-KD-Sera, BKD-Bakterienstämme (unbehandelt und hitzeinaktiviert in Suspension), homogenisiertes Nierengewebe und kalt- bzw. hitzeextrahiertes Antigen aus der Niere infizierter Fische, wobei unabhängig von der Aufbereitungsart positive Reaktionen auftraten. Ein Vergleich der

Doppelimmunodiffusion (hitze-extrahiertes Antigen) mit anderen diagnostischen Verfahren (klinisches Bild, Gramfärbung von Organabklatschpräparaten) ergab bei 4 Salmonidenarten gleiche Ergebnisse. Kreuzreaktionen bzw. falsch-positive Reaktionen konnten durch Vergleichstests mit anderen fischpathogenen Bakterien (z.B. *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*) sowie nichtinfiziertem, hitzeinaktiviertem Organmaterial ausgeschlossen werden (KIMURA et al., 1978).

Mit einer Mikromethode nach demselben Prinzip (OUCHTERLONY und NILSSON, 1973) erzielten KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a,b) vergleichbare Ergebnisse, wobei sich aber ein Koagglutinationsverfahren (siehe II.3.5.) empfindlicher als die Doppelimmunodiffusionsmethode herausstellte.

3.1.4. Immunofluoreszenzfärbung - IF

Die Immunofluoreszenz basiert auf dem Nachweis eines Antigens mit Hilfe eines fluorochrom-markierten Antikörpers, wobei durch kurzwelliges Licht eine Fluoreszenz des Immunokomplexes erzeugt wird. Diese Methode wurde erstmals durch COONS et al. (1941 und 1942) erprobt. Durch RIGGS (1957) und RIGGS und BROWN (1961) konnte die Technik mit der Entwicklung von FITC (Fluorescein-isothiocyanat), das an Globulin gekoppelt wird, erheblich verbessert werden. Physikalisch beruht die Immunofluoreszenz auf dem Phänomen der Fluoreszenz, d.h. daß das Fluorochrom-Molekül bei der Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht Energie absorbiert und unter Aussendung von sichtbarem Licht wieder abgibt. Eine Reihe von Faktoren beeinflußt die Qualität der Fluoreszenz. So ist z.B. für den Farbstoff der Fluoreszeinkonjugate ein pH von 8,0 optimal. Längere Bestrahlung (UV-Licht, Tageslicht) führt zum Ausbleichen der Fluoreszenz FITC-gefärbter Präparate aufgrund oxidativ-dissoziativer Veränderungen der Moleküle. Es gibt zwei gebräuchliche Färbemethoden: die direkte (dIF) und die indirekte (IFAT) Immunofluoreszenzfärbung, die

beide Eingang in die BKD-Diagnostik gefunden haben.

3.1.4.1. Direkte Immunofluoreszenzfärbung - dIF

Bei der dIF reagiert das nachzuweisende Antigen direkt mit dem entsprechenden Antikörper, der mit dem Farbstoff (FITC) gekoppelt ist. Es handelt sich somit um einen Vorgang mit einem Färbeschritt (MAYR et al., 1977 b).

BULLOCK et al. (1980) erprobten die dIF für "*Renibacterium salmoninarum*" am Bakterienabstrich und Organabklatschpräparat. Sie erzielten im Vergleich mit der indirekten Methode die gleiche Empfindlichkeit, jedoch benötigte ein Färbevorgang erheblich weniger Zeit (7 min). Als fluoreszierenden Farbstoff verwandten sie FITC (Fluoresceinisothiocyanat), das mit den gereinigten IgG-Fractionen eines Kaninchen- und eines Ziegen-Anti-KD-Serums nach Standardmethoden von JOHNSON und HOLBOROW (1973) konjugiert worden war.

BULLOCK et al. (1980) stellten Abklatschpräparate des zu untersuchenden Materials (Organ, Kotprobe) her, die luftgetrocknet wurden, 2 min bei 60 °C fixiert, dann mit dem Konjugat und anschließend mit einer Gegenfärbelösung (Rhodamin 1:150-200) gefärbt wurden. Die Gegenfärbung diente dazu, unspezifische Hintergrundfluoreszenzphänomene zu vermindern. Anhand von formalin-inaktivierten Bakterienkulturabstrichen ermittelten BULLOCK et al. (1980) für ihr Kaninchen-Antiserum-Konjugat eine Arbeitsverdünnung von 1:40, für das Ziegen-Antiserum-Konjugat 1:80. Mit anderen gram-positiven bzw. gram-negativen Keimen ergaben sich keine Kreuzreaktionen, somit konnte die Reaktion des Konjugates mit dem Bakterium als spezifisch betrachtet werden. Ein Vergleich mit der Gramfärbung am Organabklatsch im Feldversuch erbrachte eine wesentlich höhere Empfindlichkeit der direkten Immunofluoreszenztechnik; so waren 68 % der Nieren bei der dIF gegenüber 35 % bei der Gramfärbung positiv. Nach KLONTZ (1982) können mit der direkten IF bereits 10 Bakterien

in einem Abklatschpräparat entdeckt werden. FRYER und SANDERS (1981) stellten einen Methodenvergleichstest zur Erkennung von Carriern an. Dabei erwies sich die dIF empfindlicher als die anderen diagnostischen Hilfsmittel (klinisches Bild, Gramfärbung, Immunodiffusion, Coagglutination).

3.1.4.2. Indirekte Immunofluoreszenztechnik - IFAT

Für die IFAT (JOHNSON und HOLBOROW, 1973; JOHNSON et al., 1974; BULLOCK und STUCKEY, 1975; MAYR et al., 1977 b) wird ein nicht markiertes Immunserum benötigt, das spezifische Antikörper aufweist und wenige oder keine Antikörper gegen das Gewebe bzw. Zellmaterial enthält. Ferner ist ein speziesspezifisches Antiglobulinserum mit FITC-markierten Antikörpern erforderlich. Die Färbung erfolgte nach der auch "Sandwichtechnik" genannten Indirekten Immunofluoreszenz in der Reihenfolge, daß das Antigen mit nicht markierten Antikörpern reagiert. Nach erfolgter Bindung wird der Antigen-Antikörper-Komplex mit gegen den Antikörper gerichteten, FITC-markierten Antikörpern "gefärbt". Dieses indirekte Vorgehen erbringt laut ESPMARK et al. (1971) eine 5-30 mal höhere Empfindlichkeit als die direkte Immunofluoreszenzfärbung, da die Bindungsrate von Antikörper pro Antigen bedingt durch die zwei Färbeschritte höher wird und daraus wiederum eine stärkere Fluoreszenz resultiert.

Der indirekten IF bedienten sich BULLOCK et al. (1975) beim Nachweis von "Renibacterium salmoninarum" am Bakterienkulturabstrich sowie am Organabklatschpräparat.

Die Anti-KD-Sera wurden aus dem Kaninchen und der Ziege gewonnen; im entsprechenden Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Ziegen-Serum wurde der Antikörper mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) markiert. Die Arbeitsverdünnung der Seren und Konjugate wurde mit BKD-Bakterienstämmen, die nach der indirekten IF mit verdünntem Serum und Konjugat gefärbt worden waren, bestimmt.

Mehrere "Renibacterium salmoninarum"-Stämme und Isolate ergaben

fluoreszenzserologisch dasselbe Bild. Kreuzreaktionen mit einigen anderen grampositiven und gramnegativen (z.B. *Aeromonas salmonicida*) Bakterien konnten nicht festgestellt werden.

Für den Nachweis des Erregers im infizierten Fisch wurden frische, formalin-fixierte (18 Monate aufbewahrt) und tiefgefrorene Nierenabklatschpräparate verwendet, wobei das Resultat keine Abhängigkeit der Testempfindlichkeit von der Materialaufbereitung ergab. Die bei Organmaterial auftretende unspezifische Hintergrundfluoreszenz konnte durch Rhodamin-Gegenfärbung (JOHNSON et al., 1974) reduziert werden. Im Vergleich mit der Gramfärbung und der Erregeranzucht konnten mit der IFAT wesentlich bessere Resultate erzielt werden (BULLOCK und STUCKEY, 1975; PATERSON et al., 1979; LAIDLER, 1980; EVELYN et al., 1981; LALLIER et al., 1981; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b). Obwohl laut KLONTZ (1982) in der Empfindlichkeit zwischen der direkten und indirekten Immunfluoreszenztechnik kein Unterschied besteht, spielt die letztere eine größere Rolle in der BKD-Diagnostik (ROBERTS, 1978; MITCHUM et al., 1979; PATERSON et al., 1979; SCHÄPERCLAUS, 1979; EVELYN et al., 1981; LALLIER et al., 1981; PATERSON et al., 1983; HOFFMANN et al., 1984; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b).

3.1.5. Koagglutination

FORSQREN und SJÖQUIST (1966) stellten fest, daß die Fc-Fraktion der IgG-Moleküle an das Protein A eines *Staphylococcus aureus*-Stammes (Cowan I) gebunden werden kann, ohne die Bindungsaktivität des Immunglobulins mit dem spezifische Antigen zu stören. Der darauf basierende Koagglutinationstest mit sensibilisierten Staphylokokken wurde bereits für den Nachweis von Pneumokokken (KRONVALL, 1972), β -hämolisierenden Streptokokken (EDWARD und LARSON, 1974), *Neisseria gonorrhoeae* (CHRISTENSEN et al., 1973) und *Hämophilus influenzae* Typ B (SUKSNONG und DAJANI, 1977)

eingesetzt.

KIMURA (1978) und KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a,b) beschreiben ein Koagglutinationsverfahren für "*Renibacterium salmoninarum*"; dabei verwandten sie als Protein-A-Träger eine stabilisierte Suspension des *Staphylococcus aureus*-Stammes ATCC 12598 (Cowan I) und als Antikörper Kaninchen-Anti-KD-Sera, die sie nach einer Methode von EDWARD und LARSON (1974) miteinander koppelten. Dadurch traten allerdings bei den Antiseren Agglutinititerverminderungen auf.

Als nachzuweisendes Antigen diente "*Renibacterium salmoninarum*" in Form eines hitze-extrahierten Antigens und als hitzebehandelte Bakterienzellen. Es wurde eine 10%-ige Bakteriensuspension 30 min auf 100 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert. Aus infizierten Nieren wurde ebenfalls hitze-extrahiertes Antigen gewonnen, indem ein 10%-iges (in PBS) Gewebshomogenat 30 min auf 100 °C erhitzt und abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verwandt. Im Test wurden gleiche Volumina (0,05 ml) antikörpersensibilisierter Staphylokokkensuspension und Antigen auf einem Objektträger vermischt. Die Reaktion erfolgte in einer feuchten Kammer und wurde nach 30, 60 und 120 min mit bloßem Auge und bei 10-facher Vergrößerung abgelesen. Zur Überprüfung der Spezifität wurden hitze-extrahiertes Antigen (2 "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme, *Aeromonas salmonicida* ATCC 14174, ein *Vibrio anguillarum*-Stamm) und eine hitze-behandelte BKD-Zellsuspension gegen verschiedene Antiseren getestet (Kaninchen-Anti-*Vibrio anguillarum*-Serum, Kaninchennormalserum, drei Kaninchen-Anti-KD-Sera), wobei keine Kreuzreaktionen feststellbar waren. Umgekehrt wurden dieselben Antiseren an Protein A gekoppelt gegen eine Reihe von hitze-extrahierten Antigenen (vier *Aeromonas salmonicida*-Stämme, vier *Vibrio anguillarum*-Stämme, je ein *Escherichia coli*-, *Pseudomonas fluorescens*- und *Bacillus subtilis*-Stamm, zwei "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme) getestet. Dabei ergaben sich nur zwischen den antikörpersensibilisierten Staphylokokken und dem homologen Antigen

positive Reaktionen, was den hohen Spezifitätsgrad der Koagglutination demonstriert.

Kreuzreaktionen mit Gewebeextrakten BKD-freier Fische waren ebensowenig zu beobachten wie mit Kaninchennormalserum, das an Staphylokokken-Protein-A gekoppelt worden war.

Im Vergleich mit anderen diagnostischen Verfahren ist die Koagglutination laut KIMURA und YOSHIMIZU (1981 a,b) eine relativ einfache Technik, deren Empfindlichkeit derjenigen von Doppelimmunodiffusion und Gramfärbung entspricht. FRYER und SANDERS (1981) kamen in Vergleichsversuchen zu folgender Reihenfolge der Testsensibilität: IFAT, Koagglutination, DID, klinisches Bild und Gramfärbung.

3.2. Nachweis von Antikörpern gegen "*Renibacterium salmoninarum*"

3.2.1. Agglutinationsmethode

Der Nachweis von Antikörpern in Seren verschiedener Salmonidenarten mittels der Agglutinationsmethode wurde bereits für *Aeromonas salmonicida* (DUFF, 1942; KRANTZ et al., 1963; KRANTZ und HEIST, 1970; KIMURA und AWAKURA, 1977; KIMURA, 1978; WEBER und ZWICKER, 1979; HAHNEL et al., 1983), für *Yersinia ruckeri* (MCCARTHY und JOHNSON, 1982) sowie für eine Reihe ubiquitärer Wasserkeime (BULLOCK und SNIESZKO, 1969) geführt. Es wurden sowohl Untersuchungen zur Verbreitung der jeweiligen Bakterien als auch zum Agglutininintiterverhalten bei Vakzinierungsversuchen angestellt.

Die Agglutination ist laut MAYR et al. (1977 b) eine in vitro durchgeführte Antigen-Antikörperreaktion, die mit Bildung von großen, dreidimensionalen Konglomeraten einhergeht. Diese unlöslichen Komplexe, flocken aus und sedimentieren spontan unter Bildung eines Niederschlages, der sich am Reaktionsgefäßboden absetzt. Der Vorgang beruht auf der Bindung der antidiagnostischen Stellen des Antikörpermoleküls mit den ebenfalls

reaktiven determinanten Gruppen des Antigens. Bei diesem reversiblen Bindungsvorgang werden elektrostatische, van der Waal'sche Kräfte und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken wirksam. pH-Wertänderungen (Optimum: pH 7,0-7,8), Ionenstärke und Temperatur beeinflussen die Bindungskäfte zwischen den Molekülen.

Die Agglutination wurde bei Bakterieller Nierenerkrankung der Salmoniden als Objektträgerschnellmethode und als Mikrotitermethode getestet.

3.2.1.1. Objektträgerschnellmethode

Die Objektträgeragglutination ist ein schneller, qualitativer Screening-Test, bei dem unverdünntes homologes Antiserum als positive Kontrolle und ebenso unverdünntes Testserum auf einem Objektträger mit einer Bakteriensuspension (in physiologischer Kochsalzlösung) vermischt werden. Die Agglutinationsreaktion zwischen Antigen und Antikörper wird mit bloßem Auge abgelesen (ROBERTS, 1978; WEBER und ZWICKER, 1979).

3.2.1.2. Mikrotitermethode

Die quantitative Erfassung der agglutinierenden Antikörper im Serum erfolgt im Mikrotitersystem. Dabei reagieren antikörperhaltige Seren in einer Verdünnungsreihe mit jeweils gleichen Antigenmengen; die letzte Verdünnungsstufe mit positiver Reaktion stellt den Agglutininintiter dar, der entweder als Verdünnungsverhältnis oder als dessen reziproker Wert angegeben wird. Als Positivkontrolle dienen aus dem Kaninchen gewonnene hochtitrige Antiseren. In der Regel wird das Bakterium in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bei 62 °C 45 min hitzeinaktiviert (EVELYN, 1971; WEBER und ZWICKER, 1979; PATERSON et al., 1981). BULLOCK et al. (1974) verwandten nicht bzw. mit Ultraschall behandeltes (60 W, 14 sec) Bakterium.

Anschließend wird die Antigensuspension photometrisch standardisiert, wobei die in Tabelle 3 genannten Werte gemessen wurden.

Tabelle 3: Literaturangaben zur optischen Dichte der Antigensuspension für die Agglutinationsmethode

Optische Dichte (OD)	Wellenlänge	Autoren
0,9	520 nm	WEBER und ZWICKER, 1979
1,0	420 nm	PATERSON et al., 1981
0,9	420 nm	BULLOCK et al., 1974
1,25	420 nm	EVELYN, 1971

Die Testseren aus dem Fisch wurden nach Standardmethoden gewonnen (EVELYN, 1971; WEBER und ZWICKER, 1979) und können bei 5 °C ohne Titerverlust bis zu 3 Wochen aufbewahrt werden, oder bei - 20 °C mindestens 8 Monate tiefgefroren werden (EVELYN, 1971). Der Test erfolgte in Mikrotiterplatten, in denen das Serum mit physiologischer NaCl-Lösung in 2-er Potenz verdünnt wurde, danach wurden je gleiche Volumina (25-50 µl) Antigensuspension zugefügt; die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in 3 Stunden (WEBER und ZWICKER, 1979) oder bei 42 °C in 1 Stunde. Die Platten wurden anschließend über Nacht bei 4-5 °C aufbewahrt und dann abgelesen. Agglutinititer $\leq$ 1:10 bzw. $\leq$ 10 wurden von EVELYN (1971) sowie WEBER und ZWICKER (1979) in ihren Testreihen als negativ gewertet.

Bisher wurde die Bestimmung des Antikörpergehaltes im Serum durch Agglutination unter anderem zur Überprüfung des Erfolgs von Vakzinierungsversuchen bei verschiedenen Salmoniden eingesetzt. So konnten BAUDIN-LAURENCIN et al. (1977) mit der Mikrotiteragglutination an einmalig intraperitoneal geimpften Sil-

berlachssetzlingen (0.kisutch) 6 Monate ansteigende Titer bis durchschnittlich 1:320 feststellen, die dann nach 4 Monaten wieder auf durchschnittlich 1:115 abgefallen waren. Eine Immersionsvakzine bei Silberlachsbrütlingen konnte nur sehr schwache Agglutinintiter erzeugen.

EVELYN (1971) wies noch 16 Monate nach einer intraperitonealen Injektion hitzeinaktivierter, adjuvans-versetzter BKD-Bakterien Agglutinine im Serum von Sockeye-Lachsen nach. Nach einer zweiten Injektion, die 3 Monate nach der ersten erfolgte, war eine deutliche anamnestiche Reaktion festzustellen, wobei maximale Agglutinintiter von 1:2560 - 1:10240 nach 90 Tagen erzielt wurden. PATERSON et al. (1981 a,b) vakzinieren Atlantische Lachse (*Salmo salar*) i.p. mit hitzeabgetöteten Bakterien in Freund'schem Adjuvans. Bei Fischen unter einem Jahr konnten nach 5 Wochen deutlich erhöhte Agglutinintiter im Serum nachgewiesen werden, die sich maximal bis 20480/40960 in der 24. Woche p.inj. steigerten und bis zur 69. Woche p.inj. abfielen. Nach 90 Wochen konnten PATERSON et al. (1981 b) keine belastbare Immunität mehr feststellen. Bei Fischen über einem Jahr, die wie oben beschrieben vakzinieren wurden, stellte sich nach 31 Wochen bei 90% der Geimpften eine positive Agglutinintiterantwort im Serum (bis zu 20480) ein. Agglutinintiteranstiege in Hautmukus konnten ebenso verfolgt werden. Die Agglutinationsmethode eignet sich nach BULLOCK et al. (1974) auch zur serologischen Identifizierung von Bakterienisolaten.

WEBER und ZWICKER (1979) erprobten die Mikrotiteragglutination bei Felduntersuchungen an Fischen aus 3 kanadischen Flüssen: obwohl es sich um klinisch inapparentes Untersuchungsmaterial handelte, waren in allen Gewässern Agglutinintiter gegen "*Rennibacterium salmoninarum*" im Serum der Fische feststellbar, die in 2 Flüssen 40-80 betrugten. In dem dritten, in dem BKD seit langem endemisch war, gingen die Maximaltitere über 640 hinaus und die Durchschnittstiterhöhe war erheblich größer. Die Vorzüge der Mikrotiteragglutination liegen in der schnellen Er-

fassung enzootischer Gebiete und der Carrier-Diagnostik, die mit sehr geringem Aufwand betrieben werden kann, da lediglich Blutproben gezogen werden müssen (BULLOCK et al., 1974; WEBER und ZWICKER, 1979). Obwohl der Wert der Agglutinationsmethode von AMEND und JOHNSON (1984) unbestritten blieb, stellten sie den Aussagewert der Agglutinititerhöhe für die Belastbarkeit der Immunität allerdings in Frage.

4. Differentialdiagnose

Differentialdiagnostisch zur Bakteriellen Nierenkrankheit der Salmoniden "BKD" sind eine Reihe von Krankheiten mit anderer Ätiologie, aber ähnlichem Erscheinungsbild auszuschliessen. Es handelt sich dabei um virale, bakterielle und pilzbedingte Erkrankungen, sowie sonstige mit teils ungeklärter Ursache. In folgender Tabelle 4 sind die wichtigsten Ursachenkomplexe zusammengefaßt.

Tabelle 4: Übersicht über die Differentialdiagnosen zur BXD bei Saimoniden

Viruskrankheiten:

Nukleinsäuretyp	Gruppe	Virus	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
RNS	Rhabdoviren	IHNV-Virus	IHN,	Abdunkeln, Exophthalmus, Aszites,	AMLACHER, 1981 u. 1986
			Infektiöse	Abdomenschwellung, Nierenschwellung,	AHNE, 1980
RNS	Rhabdoviren	IHNV-Virus	Hämatopoetische	Blutungen (in Muskulatur, Serosen,	BENDELE u. KLONTZ, 1975
			Nekrose	Fettgewebe, Meningen), Hämorrhagien	KLONTZ, 1982
				der Haut (Flossenbasen); histologisch: Nekrosen im hämatopoetischen Nieren- und Milzgewebe	YASUTAKE, 1975
RNS	Rhabdoviren	VHSV-Virus, Egtvedvirus	Virale		AHNE, 1980
			Typ I u. II	Abdunkeln, Exophthalmus, Aszites, Hämorrhagien (in Muskulatur, Haut, Magen-Darm-Trakt); chronisch:	AMLACHER, 1981 u. 1986
RNS	Rhabdoviren	VHSV-Virus, Egtvedvirus	Septikämie	Anämie, Aszites, Exophthalmus, Nierenschwellung, Enteritis; histologisch: Nekrosen des hämatopoetischen Nierengewebes, der Leber, Milz und Muskulatur	BENDELE u. KLONTZ, 1975
					GAINES u. ROGERS, 1975
					GHITTINO, et al. 1977
RNS	Rhabdoviren	VHSV-Virus, Egtvedvirus			KLONTZ, 1982
					YASUTAKE, 1975

Fortsetzung Tabelle 4:

Bakterielle Krankheiten:

Familie	Genus	Spezies	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
Cytophagaceae (gleitende Bakterien)	Flexibacter	Flexibacter	Columnariskrank- heit, Myxobakteri- ose, Bakterielle	Haut- und Kiemenläsionen, Haut- ulzera an Kopf, Rücken, Flossen- basen	AMLACHER 1981, 1986
		(Bacillus, Chondrococcus, Kiemenkrankheit Cytophaga co- lumnaris)			BULLOCK et al., 1971 MUNRO, 1982 ROBERTS, 1978 RUCKER et al., 1953 SNIESZKO, 1980
		Flexibacter	Kaltwasser("Cold water")-Krankheit psychrophila Schwanzstiel("Pe- duncle")-Krankheit	Läsionen und ulzerative Nekrosen von Haut, Flossen u. Muskulatur	
		Flexibacter spp.	Bakterielle Kie- menkrankheit "Saddle Back"- Krankheit	Kiemen- und Flossenläsionen umschriebene Hautläsionen im Rückenflossenbereich	MORRISON et al., 1981

Fortsetzung Tabelle 4:

Familie	Genus	Spezies	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
Spirillaceae (gram-negative Stäbchen)	Vibrio	Vibrio spp.	Vibriose	akut: Anorexie, Abdunkeln, Abdomen- u. Periorbitalschwellung, Hautläsionen u. -ulzera, Milz- u. Nierenschwellung, petechiale Blutungen im Peritoneum, herdförmige Blutungen am Herzen; chronisch: Granulome, Anämie, fibrinöse Peritonitis, Augenveränderungen (Korneatrübung, -ulzera, Verlust des Auges)	AMLACHER, 1981 AMLACHER, 1986 MUNRO, 1982 ROBERTS, 1978
	Aeromonas	Aeromonas salmonicida	Furunkulose	akut: Abdunkeln, Enteritis, Hämorrhagien an Flossenbasen u. in Muskulatur, Hautulzera u. -furunkel, Hautabszesse, Milzschwellung, Blutungen in Niere und Leber; histologisch: u.a. herdförmige Nekrosen der Niere (hamatopoetisches Gewebe)	AMLACHER, 1981 AMLACHER, 1986 BENDELE und KLONTZ, 1975 MUNRO, 1982 POPP, 1982 ROBERTS, 1978
nicht zugeordnete, gram-negative, kurze Stäbchen	Haemophilus piscium	Haemophilus	Geschwurskrankheit der Salmoniden ("Ulcer Disease")	Hautläsionen und -ulzera, Septikämie	AMLACHER, 1981 u. 1986 MUNRO, 1982 POPP, 1980 ROBERTS, 1978

Fortsetzung Tabelle 4:

Familie	Genus	Spezies	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
Mycobacteriaceae (säurefeste Stäbchen)	Pasteurella	Pasteurella spp.	(bei hämorrhagischer Septikämie)	akut: hämorrhagische Septikämie chronisch: Pseudotuberkel in Niere, Leber, Milz	AMLACHER, 1981 u. 1986 MUNRO, 1982 ROBERTS, 1978
	Mycobacterium	M. marinum M. piscium M. fortuitum	Fischtuberkulose	Abdunkeln, Exophthalmus, Abmagerung, Abdomenschwellung, Aszites, miliare Tuberkel in Leber, Niere und Milz, histologisch: käsige, nekrotische Herde in allen Organen	AMLACHER, 1981 u. 1986 BENDELE u. KLONTZ, 1975 KLONTZ, 1982 MUNRO, 1982 POPP, 1980 ROBERTS, 1978 RUCKER et al., 1953
	Nocardia (gram-positive Bakterien)	N. asteroides N. kansasii	Nocardiose	Anorexie, Schwellungen im Kopfbereich und Abdomen, Granulome auf Organen, Muskelinfektionen (hämorrhagische Nekrosen), Nierenschwellung, Abmagerung, Hautläsionen und -ulzera; chronisch: verkäsende Herde in Muskel, Haut, Milz, Niere, Schwimmblase	AMLACHER, 1981 u. 1986 GHITTINO et al., 1977 KLONTZ, 1982 MUNRO, 1982 POPP, 1980 ROBERTS, 1978

Fortsetzung Tabelle 4:

Pilzkrankheiten:

Taxonomie	Genus	Spezies	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
Phycomycetes/ Entomophthora- les	Ichthyosporidium	Ichthyosporidium (Ichthyosporidium phonus hoferi)	Ichthyosporidio- se, Ichthyospori- phonosis, Tau- melkrankheit	Nekrosen und Granulome in den inneren Organen (v.a. Herz, Leber, Niere), Läsionen und Ulzera der Haut; histologisch: Entwicklungsstadien des Pilzes (ruhen- de Sporen, germinative Sporen, Hyphen)	ANLACHER, 1981 u. 1986 BENDELE u. KLONTZ, 1975 GHITTINO et al., 1977 POPP, 1980 RUCKER et al., 1953 WOLKE, 1975

Sonstige Erkrankungen:

Ursache/Erreger	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
Protozoen (nicht zugeordnete PKX- Zellen)	PKD - Proliferative Nierenerkrankung	Exophthalmus, Abdomen-, Nieren- und Milzschwellung, Aszites, Anämie (blas- se Kiemen); histologisch: PAS-positive PKX-Zellen, granulomato- se Proliferation von Makrophagen, Lympho- zyten und Histiozyten in der Niere	ALDERMANN u. ROGERS, 1984 D'SILVA et al., 1984 ELLIS et al., 1982 HEDRICKS et al., 1984 HOFFMANN und DANGSCHAT, 1981 SMITH et al., 1984

Fortsetzung Tabelle 4:

Ursache/Erreger	Krankheit	Klinisches Bild	Autoren
unbekannt	Nephrocalcinose	weißliche Verfärbungen der Niere (fleckig, streifig); histologisch: Glomerulonephritis, Calciumsalzablagerungen in Nierentubuli, Ureteren, Harnsammelröhrchen	BENDELE und KLONTZ, 1975 GHITTINO et al., 1977 HARRISON, 1977 PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 b
unbekannt	Geschwülste: Lymphosarkom Adenocarcinome, Adenome, Fibrosarkome, Lymphom	Graueiße Verfärbung und Schwellung der Niere (Regenbogenforelle) histologisch: große, atypische, lymphoide Zellsammlungen mit hoher Mitoserate	EHLINGER, 1963 AMLÄCHER, 1981 u. 1986 ASHLEY, 1967 BENDELE u. KLONTZ, 1975 GHITTINO et al., 1977 SMITH, 1971 SCHLUMBERGER u. LUCKE, 1948

5. Fischimmunologie

Fische haben bereits komplexe Immunmechanismen entwickelt, die, soweit bisher bekannt, denen der höheren Wirbeltiere entsprechen (CORBEL, 1975; ELLIS, 1982 und 1977; SCHÄPERCLAUS, 1979).

5.1. Immunkompetente Organe

Analog zu den Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten der Säugetiere werden die Zellen der lymphatischen Reihe in den bei Fischen immunkompetenten Organen Thymus, Milz und Niere gebildet.

Im Verlauf der Ontogenese ist der Thymus das erste Organ, das lymphoiden Charakter annimmt (ELLIS, 1982 und 1977; MANNING et al., 1982). Bereits in der phylogenetisch ältesten Klasse der Fische, den Cyclostomata (Neunaugen) konnte ein epithelialer Thymus (CORBEL, 1975) nachgewiesen werden. Bei Knochenfischen (Teleostei) ist das Organ paarig, oberflächlich am oberen Kiemendeckelwinkel (ELLIS, 1977 und 1982; OLLENSCHLÄGER, 1978) gelegen und bereits in Mark- und Rindenzone eingeteilt. Es enthält mitotisch aktive und sich differenzierende Lymphozyten, Makrophagen und Epitheloidzellen. Laut MANNING et al. (1982) sind bei der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) ab dem fünften Tag vor dem Schlüpfen lymphoide Zellen feststellbar; die immunologische Reife und volle Differenzierung erreicht das Organ ab der ersten Futteraufnahme (ELLIS, 1977 und 1982). Die Involution des Thymus tritt bei der Regenbogenforelle etwa ab der Geschlechtsreife ein (ELLIS, 1977).

Neben dem Thymus ist die Niere das wichtigste lymphoide Organ der Knochenfische. Die Lympho-, Erythro- und Granulopoese findet im hämatopoetischen Gewebe der Niere (v.a. in der Kopfniere, dem Pronephros) statt, die damit die Funktion des Knochenmarks bzw. die Filterrolle (Phagozytose) der Lymphknoten der Säugetiere übernimmt (CORBEL, 1975; OLLENSCHLÄGER, 1978; ELLIS,

1976, 1977 und 1982). CHILLER et al. (1968 und 1969 a,b) und RIJKERS et al. (1980) konnten nach Antigenstimulation bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) in der Vorderniere sowohl antikörperproduzierende und -tragende Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und blastenähnliche, sowie eosinophile Zellen) nachweisen.

Laut ELLIS (1977a und 1982), AGIUS (1979 und 1980) und ROBERTS (1975) enthält die Niere der Knochenfische pigmenthaltige Zellen, die in sogenannte Melanomakrophagenzentren zusammengefaßt sind. Diese weisen zudem noch Lymphozyten und antikörperhaltige Zellen auf. Bei Regenbogenforellen konnten MANNING et al. (1982) bei 14 °C ab dem 5. Tag nach dem Schlupf lymphoide Zellen in der Niere feststellen, beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) bei 21-23 °C bereits am 2. Tag nach dem Schlüpfen.

Dagegen hat die Milz in den ersten Lebensmonaten bei der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) vorwiegend blutbildende Funktion (MANNING et al., 1982). Die Milz, die auf der Stufe der Cyclostomata (Schleimaal, *Eptatretus stoutii*) lediglich als Ansammlung hämatopoetischer Zellen (v.a. Erythroblasten) im Verdauungstrakt zu finden ist, weist bei den Elasmobranchii und den höheren Fischen eine Einteilung in rote und weiße Milzpulpa auf und ist für die Erythro-, Granulo- und Lymphopoese zuständig (CORBEL, 1975).

Zur Zeit der ersten Futteraufnahme entwickeln sich laut ELLIS (1977 b), VAN LOON et al. (1980) und GRACE et al. (1980) bereits die lymphoiden Zellansammlungen in Milz und Niere, in denen nach Antigenstimulation auch Plasmazellanaloge zu beobachten sind (ELLIS, 1982). Neben der Differenzierung, Lagerung und Reifung dieser immunkompetenten Zellen (Lymphozyten) nimmt die Fischmilz wichtige Filteraufgaben wahr. So werden in den Retikulinfasernetzen ihrer ellipsoiden Kapillaren lösliche Antigene aus dem Blut abgefangen (ELLIS, 1980; SECOMBES und MANNING, 1980; SECOMBES et al., 1980), phagozytiert und von den Makrophagen in die Melanomakrophagenzentren (ELLIS et al., 1976;

AGIUS, 1970) transportiert.

5.2. Immunsystem der Fische

Das Immunsystem der Fische ist wie dasjenige höherer Wirbeltiere sowohl zur unspezifischen, als auch zur spezifischen Abwehr fähig, wobei den unspezifischen Mechanismen beim Fisch eine weitaus größere Rolle zugeschrieben wird (CORBEL, 1975; SCHÄPERCLAUS, 1979; MANNING et al., 1982).

5.2.1. Unspezifische Immunität

Die unspezifische Abwehr, die Resistenz, wird in physikalisch-chemische (z.B. Körpertemperatur, Magensäure, externe Mukusschicht mit bakteriziden und fungiziden Eigenschaften), humorale und zelluläre Faktoren unterteilt.

Zu den unspezifischen humoralen Faktoren zählen beim Fisch laut LIEFMANN (1911) natürliche Hämolysine, laut HODGINS et al. (1967) Hämagglutinine, das Lysozym im Serum (LUK'YANENKO, 1965; SCHÄPERCLAUS, 1979) sowie Properdin und Komplement (CUSHING, 1945; LUK'YANENKO, 1966; SCHÄPERCLAUS, 1979).

Laut CORBEL (1975) ist die Existenz des Komplementsystems für die phylogenetisch niedrigerstehenden Cyclostomata nicht eindeutig nachgewiesen, aber für die Elasmobranchii (Haie und Rochen) CHONDROSTEI (Störe) und Teleostee ("echte" Knochenfische") belegt (GEWURZ et al., 1966; LEGLER et al., 1967; CHILLER et al., 1969 b).

Über die biochemischen Komponenten, die Aktivierung und die funktionelle Bedeutung des Fischkomplementsystems ist nach ELLIS (1982) nur bekannt, daß es in Anwesenheit von Calcium und Magnesiumionen lytische Aktivitäten entwickelt. Dabei ist die Anwesenheit von Antikörpern nicht erforderlich. Serumantikörper von Regenbogenforellen können laut NONAKA et al. (1981) zwar Komplement binden, aber nicht aktivieren. Für Regenbogenforel-

lenkomplement gilt laut ELLIS (1982) 25 °C als Temperatur-optimum (Säugetiere 37 °C), bei 44 °C wird es in 20 Minuten inaktiviert (SAKAI, 1981 b). Für den Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) und den Goldfisch (*Carassius auratus*) stellte SAKAI (1981 b) eine Komplementinaktivierungstemperatur von 45 °C in 20 min fest.

Die Existenz von Interferon wurde in vitro an Fischzellen (GRAVELL und MALSBERGER, 1965; BEASLEY et al., 1966; OIE und LOH, 1969) nachgewiesen. KINKELIN und DORSON (1973) und DORSON et al. (1975) fanden Interferon auch bei lebenden Regenbogenforellen.

Die zelluläre unspezifische Abwehr erfolgt durch Phagozytose, die nach MANNING et al. (1982) und GRACE (1981) und GRACE et al. (1981) bei Regenbogenforellen ab dem vierten, beim Karpfen ab dem 14. Lebenstag nachgewiesen wurde. Die Aufnahme von Fremdpartikeln durch dazu fähige Zellen kann laut SCHÄPERCLAUS (1979) organgebunden in Kapillarwandzellen, im Gewebe (Monozyten), im lymphoiden Gewebe des Magen-Darm-Traktes und den Retikulum- und Sinusendothelzellen retikulärer Organe (Milz, Niere) vorkommen.

Bei Entzündungen mit viraler, bakterieller, mykotischer und parasitärer Ursache wandern wie bei Säugetieren Phagozyten (Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Melanomakrophagen, Monozyten) ins Gewebe ein (WOOD et al., 1955; WOOD und ORDAL, 1958; POST, 1963; KLONTZ et al., 1965; KLUGE, 1965; ROBERTS et al., 1969). Nach KLONTZ (1972) ist bei Regenbogenforellen vier Stunden nach Antigeninjektion eine zelluläre Reaktion mit Makrophagen zu beobachten. Laut ELLIS (1977 a,b) gehören die Makrophagen zu den zirkulierenden Leukozyten; über ihre genaue Funktionsweise ist wenig bekannt. Sie reagieren aber laut ELLIS (1982) positiv auf den MIF-(Makrophagenwanderungshemmungs-)Test und sind morphologisch denen von Säugetieren ähnlich. Sie kommen laut ELLIS (1977), ELLIS et al. (1976) und MCKINNEY et al. (1977) in Herz (Atrium), Niere, Milz und Peritoneum, aber nicht im Thymus vor.

5.2.2. Spezifische Immunabwehr

Die individuell erworbene, spezifische Abwehr basiert bei Fischen auf zellulären und humoralen Komponenten (SCHÄPERCLAUS, 1979). Zu den ersteren gehören sowohl Lymphozyten, die zu Plasmazellen transformiert die freien Antikörper der humoralen Abwehr (KLONTZ, 1972) produzieren, als auch solche, die Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen (ELLIS, 1977 a,b). Die höheren Wirbeltiere besitzen T- und B-Lymphozyten, die zu Immunzellen bzw. zu Antikörper produzierenden Plasmazellen (ROLLE und MAYR, 1978) werden. Dagegen gibt es bei Fischen lediglich Hinweise auf die Existenz von T- und B-Lymphozyten (ELLIS, 1977 a und 1982). So konnten in einer Reihe von Organen (Thymus, Niere, Milz, Blut) durch Immunofluoreszenz Lymphozyten mit membranständigen Immunglobulinen nachgewiesen werden (ELLIS und PARKHOUSE, 1975; EMMTICH et al., 1975; ETLINGER et al., 1976; CLEM et al., 1977; WARR et al., 1977; WARR und MARCHALONIS, 1980). Ferner weist auf die Heterogenität der Fischlymphozyten ihre unterschiedliche Reaktion auf mitogene Substanzen hin (ELLIS, 1982). Für eine Helferzellfunktion bei erneutem Antigenkontakt einer T-Lymphozyten ähnlichen Subpopulation gibt es laut ELLIS (1982) bei Fischen keine Belege. MANNING et al. (1982) und SECOMBES und MANNING (1980) konnten im Lauf der Ontogenese bei 8-wöchigen Karpfen bereits auf Antigenkontakt hin eine zelluläre Primärantwort in Form von Proliferation lymphoider Zellen beobachten. HILDEMANN und THOENES (1969) registrierten nach Hauttransplantationen am Schleimaal (*Eptatretus stoutii*) starke Lymphozyteninfiltration und eine beschleunigte Abstoßungsreaktion bei wiederholter Transplantation, womit die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses (immunologische Gedächtniszellen) und die Fähigkeit zur anamnестischen Reaktion (Sekundärantwort, Booster-Effekt) bereits auf der Stufe der Cyclostomata belegt wurde (siehe auch SCHÄPERCLAUS, 1979). PAPERMASTER et al. (1964) berichteten

über eine Primärantwort für die Gruppen der Cyclostomata, der Elasmobranchii, der Holostei und der Teleostei; die Existenz einer Sekundärantwort konnten sie für die Cyclostomata jedoch nicht bestätigen. Das Phänomen der immunologischen Toleranz ist auch bei Fischen bekannt (SERERO und AVTALION, 1978; AVTALION et al., 1980; AVTALION, 1981; MANNING et al., 1982). Die Antikörper bei Fischen, ebenfalls ein Bestandteil der spezifischen humoralen Immunität, werden im folgenden (II.2.3.) gesondert besprochen.

5.2.3. Antikörper beim Fisch

BABES und RIEGLER (1903) und NOGUCHI (1903) berichteten als erste über die Existenz von Antikörpern bei Fischen, die sich laut ELLIS (1982) in den meisten Gewebsflüssigkeiten (Plasma, Lymphe, Haut- und Intestinalmukus, Blutserum) nachweisen lassen.

Im Gegensatz zu Säugetieren ist die Gefäßwand der Fische für Serumimmunoglobuline durchlässig (WARDLE 1971; MACKIE und WARDLE, 1971; ELLIS, 1982). Nach STANWORTH und TURNER (1973), SCHÄPERCLAUS (1979) und ELLIS (1982) bestehen die Immunoglobuline auch beim Fisch aus Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Je zwei große (schwere bzw. H, MG 50-77000) und zwei kleine (leichte bzw. L, MG 25000) Ketten bilden eine Einheit, die sich zum Antikörper zusammenlagern. Jede Einheit besitzt ein Fc- und ein Fab-Fragment (Abbildung 1), die unterschiedliche Funktionen besitzen. Am Fab-Fragment erfolgt z.B. die Antigenbindung. Die Einteilung der Immunoglobuline erfolgt nach Molekulargewicht, Sedimentationskonstante, Verhalten in der Elektrophorese (α -, β -, γ -Globulin) und biologischen Funktionen (STANWORTH und TURNER, 1973). Insgesamt sind fünf Klassen von Antikörpern (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) teilweise mit Subklassen (Unterschied in den Disulfidbrücken) bei Wirbeltieren beschrieben.

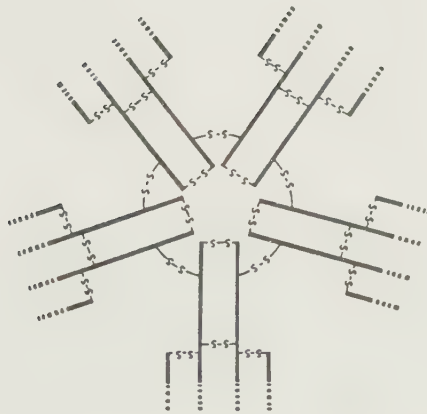
Die phylogenetisch niedriger stehenden Fische besitzen

lediglich eine Art, und zwar "IgM"-ähnliche Antikörper (LITMANN, 1975; ELLIS, 1982), die teils als Monomere (FLETCHER und GRANT, 1969; CLEM und MCLEAN, 1975; ELLIS, 1982), teils als Tetra- bzw. Pentamere (SHELTON und SMITH, 1970; LITMANN, 1975; STANWORTH und TURNER, 1973; ELLIS, 1982) vorkommen.

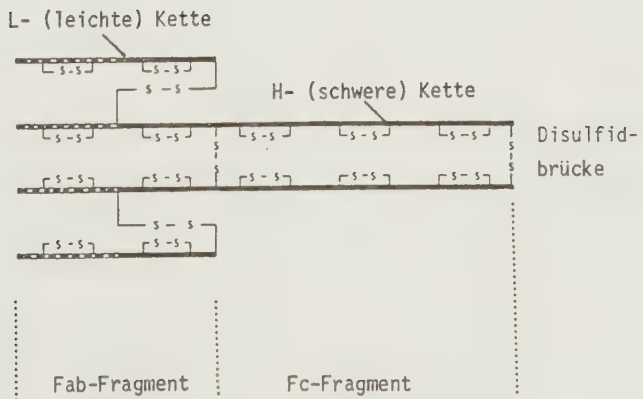
Die Lungenfische (Dipnoi) sind die einzige Gruppe, bei der zwei verschiedene Immunglobulinklassen nachgewiesen sind (ELLIS, 1982). Sie stellen damit vom immunologischen Aspekt her phylogenetisch ein Bindeglied zu den Amphibien dar (STANWORTH und TURNER, 1973).

Bei der Scholle (Teleosteer) sind die laut FLETCHER und GRANT (1969) die sekretorischen Antikörper im Mukus mit denen im Serum identisch. LOBB und CLEM (1981 b,c) und FLETCHER und WHITE (1973) hingegen berichteten, daß das sekretorische Immunglobulin im internen wie externen Mukus beim "sheepshead" (*Archasargus probatocephalus*) dimere Struktur aufweist und nicht aus dem Serumpool stamme. CORBEL (1975) diskutiert eine Verwandtschaft der sekretorischen Antikörper bei Fischen und Säugetieren.

Das menschliche IgM besitzt laut STANWORTH und TURNER (1973) ein Molekulargewicht von 900 000 (schwere Ketten MG 65000 +/- 1800), eine Sedimentationskonstante von 19 S und es kommt zu 76 % intravaskulär mit einer Halbwertszeit von 5,1 Tagen vor. Es ist fähig, Komplement zu binden, zu aktivieren und somit die Lyse von Zielzellen zu bewirken; außerdem hat es agglutinierende Eigenschaften. Nach CORBEL (1975), STANWORTH und TURNER (1973), SCHÄPERCLAUS (1979) und ELLIS (1982) ist das "IgM" der Fische nicht fähig, Komplement zu binden, ferner besitzt es hohe Antigenspezifität und -affinität. Es ist es sowohl bei der primären als auch bei der sekundären Immunantwort nachzuweisen. Nach ELLIS (1982) haben Regenbogenforellen-Immunglobuline zytolytische, agglutinierende und passiv hämagglutinierende Eigenschaften. Andere Teleosteerantikörper besitzen laut CLEM und MCLEAN (1975) und ELLIS (1982) auch präzipitierende Immunglobuline. Genauerer Aufschluß über die bei Fischen vorkommenden Antikörper gibt Tabelle 5.



**IgM-Molekül
Pentamer**



Untereinheit eines IgM-Moleküls

Abbildung 1 : IgM-Pentamer und Untereinheit
(in Anlehnung an STANWORTH und TURNER, 1973)

Tabelle 5: Überblick über die Literatur zu den Immunglobulinen der einzelnen Klassen der Fische (nach Corbel, 1975, ergänzt)

Klasse: Cyclostomata *				
Jahr/Autor(en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften	
1968	MARCHALONIS u. EDELMANN	F-2-Phage	14 S- und 6 S-Komponenten, 46 S-Komponente (agglutinierend)	
1968 (a) und 1970, POLLARA et al.	"	Bruceella abortus, Human-erythrozyten	9 S-Komponenten, MG 300 000, α -Globuline, Agglutinine	
1970, LITMAN et al.	"		Makroglobulin mit MG von 320 000 und 4 Ketten (miteinander verbunden), agglutinierend	
1969 und 1971	*, ACTON et al.	Pazifischer Schleimaal (Eptatretus stoutii)	Salmonella typhi, Bakteri- isolat aus Krebs, gram- negative Bakterien	9 S-, 13 S-, 20 S-Komponenten, hitz- labil (bei 50 °C in 20 min inakti- vierbar), durch homologe und hete- rologe gram-negative Bakterien ab- sorbierbar
1970, LINTHICUM und HILDEMAN	"	Schäferthryozyten		"IgM"-ähnliche Makroglobuline, hitze-labil (bei 56 °C in 30 min in- aktivierbar), hämagglutinierende Antikörper (Schäferthryozyten)
1970, THOENES und HILDEMAN	"	Schäferthryozyten		hitze-labiles Makroglobulin

* Tabelleneinteilung nach der zoologischen Systematik von
STEITZ und STENGEL (1984)

Fortsetzung Tabelle 5:

Klasse: Chondrichthyes Unterklasse: Elasmobranchii (Haie und Rochen)			
Jahr/Autor(en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften
1963, CLEM und SIGEL	14 Haiespezies	virale und bakterielle Antigene	γ -Globuline hämagglutinierende, neutralisierende, agglutinierende Antikörper
1963, GREY	Geigenrochen (<i>Rhinobatus productus</i>)		IgM-ähnliches Immunglobulin, 19 S- und 7 S-Komponente
1965, SIGEL und CLEM	Ammenhai (<i>Orectolobus</i>)	virales Antigen	7 S- und 19 S-Komponenten, Makroglobulin mit schweren und leichten Ketten
1967, CLEM et al.	"		7 S- und 19 S-Komponenten
1967, CLEM und SWALL	Haiespezies		IgM-ähnliches Immunglobulin (elektrophoretisch, Molekülstruktur)
1967, SURAN et al.	Leopardenhai (<i>Triakis semifasciata</i>)		7 S- und 19 S-Komponenten, IgM-ähnliche Immunglobuline

Fortsetzung Tabelle 5:

Klasse: Osteichthyes
Überordnung: Chondrostei

Jahr/Autor(en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften
1968 (a), POLLARA et al.	Löffelstör (Polydon spatula)		Makromolekül (MG 870 000), in Leichte (MG 235000) und schwere (MG 75300) Ketten auftrennbar
Überordnung: Holostei			
1969, BRADSHAW et al.	Knochenhecht (Lepisosteus platyrhynchus)		Makroglobuline (MG 870 000) mit leichten (MG 22 000) und schwe- ren (MG 70 000) Ketten, 14 S-Kom- ponente, 4 % Hexosegehalt, 1gH- ähnliche tetramere Struktur
1971, BRADSHAW et al.	Kahlniecht (Aminia clava)		14 S-Globuline (MG 634 000) und 6,5 S-Globuline (MG 146 000), tetramere Struktur der 14 S-Kom- ponente
Überordnung: Teleostei			
1942, DUFF	Regenbogenforelle (Salmo gairdneri)	Aeromonas salmonicida	Serumantikörper, spezifisch, agglutininierend
1965, HODGINS et al.			Serumimmunglobulin, β - und γ - Globulin

Fortsetzung Tabelle 5:

Jahr/Autor (en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften
1966 (a,b) POST	Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	α - und β -Globulin
1967, HODGINS et al.	"	BSA (Bovines Serumalbumin), Hämocyanin	β -Globuline, Makroglobuline (agglutinierend, präzipitierend in Immunelektrophorese), hitze- labil (bei 59 °C in 30 min in- aktivierbar)
1970, ANDERSON und KLONTZ	"	<i>Aeromonas salmonicida</i>	β 2-Globuline, präzipitierend in Immunelektrophorese
1972 (a,b), DORSON	"	PH-5-Phage	Makroglobuline, mit 7 S-Kompo- nenten, β -Globuline
1982, DÖLLER und ENZMANN	"	NPV-Virus, GV-Virus	Serumantikörper, präzipitierend (in Immunodiffusion)
1982, MCCARTHY und JOHNSON	"	<i>Yersinia ruckeri</i>	agglutinierende Serumantikörper
1982, MICHEL und FAIVRE	"	<i>Aeromonas salmonicida</i>	agglutinierende Serumantikörper
1982, POLLI	"	<i>Saprolegnia parasitica</i>	2 β - und ein α -Globulin
1963, KRAUEL und RIDGEWAY	Sockeye-Lachs (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	"	γ -Globuline
1971, EVELYN	"	"Renibacterium salmoninarum"	Makromoleküle, γ - und β 1-Glo- buline, hitze labil (bei 56 °C in 15 min inaktivierbar)

Fortsetzung Tabelle 5:

Jahr/Autor	Fischspezies	Antigen	Antikörper
1974, CISAR und FRYER	Silberlachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	<i>Aeromonas salmonicida</i>	IgM-ähnliche, tetramere Makro- globuline, 17 S-Globuline, agglutinerend
1970, ALEXANDER et al.	Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)		IgM-ähnliche Makroglobuline (β 2-Globuline, 19 S-Komponente), β 1-Globuline (7 S-Komponente)
1979, WEBER und ZWICKER	"	"Renibacterium salmoninarum", <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i>	agglutinerende Serumantikörper
1976, WILSON	"	<i>Saprolegnia parasitica</i>	
1981 (a,b), PATERSON et al.	"	"Renibacterium salmoninarum"	IgM-ähnliches, tetrameres Makro- globulin, α 1- und β 2-Globulin
1963, KRANTZ et al.	Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>), Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	<i>Aeromonas salmonicida</i>	agglutinerende spezifische Serumantikörper
1970, JIRGENSONS et al.	Aal (<i>Anguilla anguilla</i>)	Humanblutbestandteile	agglutinerende spezifische Serumantikörper
1964, AMBROSIUS und SCHÄKER	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	Schweineserum	präzipitierende (in Immunelektrophorese) spezifische Immunglobuline agglutinerende Serumantikörper, Immunelektrophoretisch präzipitierend

Jahr/Autor(en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften
1966, AMBROSIOUS	Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)		γ -Globuline
1970, SHELTON und SMITH	"		IgM-ähnliches Tetramer
1971, MARCHALONIS	"	Humanes Immunglobulin, Hämocyanin	IgM-ähnliches Makroglobulin
1966, AMBROSIOUS	Schleie (<i>Tinca tinca</i>)	Bakteriophage	γ -Globuline
1962, UHR et al.	Goldfisch (<i>Carassius auratus</i>)	<i>Aeromonas liquefaciens</i> , <i>Streptococcus</i> sp.	γ -Globuline mit 19 S- und 7 S-Komponente
1968 WATSON et al.	"	Humanes Immunglobulin, Hämocyanin	β - und γ -Globuline, agglutini- erend
1971, MARCHALONIS	"		IgM-ähnliches Makroglobulin
1972, EVERHART	"		13,2 S-Komponente, agglutini- erende Serumantikörper, po- sitiv im indirekten Hämagglu- tinationshemmungstest
1966, SUMMERFELT	"Golden Shiner" (<i>Notemigonus crysoleucas</i>)		γ -Globuline
1968, WATSON et al.	"	<i>Aeromonas liquefaciens</i> , <i>Streptococcus</i> sp.	β - und γ -Globuline, agglutini- erende Antikörper

Fortsetzung Tabelle 5:

Jahr/Autor(en)	Fischspezies	Antigen	Antikörper/Eigenschaften
1972, HARRIS	Döbel (<i>Leuciscus cephalus</i>)	<i>Acanthocephalus</i> sp., Pomphorhynchus laevis	IgM-ähnliche Serumantikörper
1982, POLLI	Rotaue (<i>Leuciscus rutilus</i>)	<i>Saprolegnia parasitica</i>	IgM-ähnliche Makroglobuline, präzipitierend (in Immunodiffusion)
1982, POLLI	Flußbarsch (<i>Perca fluviatilis</i>)	<i>Saprolegnia parasitica</i>	IgM-ähnliche Makroglobuline, präzipitierend in Immunodiffusion
Klasse: Osteichthyes Unterklasse: Sarcopterygii Überordnung: Dipnoi			
1969, MARCHALONIS	Australischer Lungenfisch (<i>Neoceratodus forsteri</i>)		2 Ig-Klassen: 19,45 S-Komponente (IgM-ähnlich), 5,9 S-Komponente (schwere Ketten mit MG 40 000)
1970 (b), LITMAN et al.	Afrikanischer Lungenfisch (<i>Protopterus aethiopicus</i>)		2 Ig-Klassen: ein IgM-ähnliches Globulin, ein 5,8 S-Globulin (schwere Ketten mit MG 38 000)

5.2.4. Einflüsse auf die Immunantwort von Fischen

Von den Faktoren, die die Immunantwort, insbesondere die Antikörperbildung, bei Fischen beeinflussen, ist die Temperatur bisher am besten untersucht.

Grundsätzlich stellt ELLIS (1982) fest, daß die höheren Temperaturen die Latenzzeit zwischen Antigenkontakt und Reaktion verkürzen und auch zu einer größeren Intensität der Antikörperproduktion führt. Auch andere Autoren registrieren einen Temperatureinfluß auf die Antikörperproduktion: BISSET (1946, 1947 und 1948 a,b), BRADSHAW und SIGEL (1968), AVTALION (1969), PATERSON (1972) und AVTALION et al. (1973). So zeigen typische Warmwasserfische wie der Karpfen (*Cyprinus carpio*) bei Temperaturen unter 15 °C sogar völliges Fehlen von Antikörperproduktion (AVTALION et al., 1976; PLISZKA, 1939 a,b), Kaltwasserfische wie die Salmoniden hingegen reagieren auf Antigenstimulation noch bis 4 °C Wassertemperatur positiv (FRYER et al., 1976). NYBELIN (1935) beobachtete bei 8 °C bei Aalen keine Immunantwort nach künstlicher Infektion mit *Vibrio anguillarum*, bei 18 °C jedoch eine starke Reaktion. Bei CUSHING (1942), CUCHENS und CLEM (1977) und AVTALION et al. (1980) wird eine verlangsamte Immunantwort infolge niedriger Temperaturen erwähnt, die von ELLIS (1982) mit erniedrigter Stoffwechselrate und infolgedessen verminderter Plasmazellaktivität erklärt wird. Als besonders temperaturempfindliche Phase bei seinen Immunisierungsversuchen erkannten AVTALION et al. (1976) die ersten Tage nach der Antigenstimulation während der Antikörperinduktion. Nach CORBEL (1975) bewirkt aufgrund dieser Tatsache eine kurzfristige Temperaturerhöhung nach der Vakzinierung bei Fischen eine ausgeprägtere Immunantwort.

Auch Dosis und Inokulationsmodus des Antigens nehmen auf die primäre und sekundäre Immunantwort Einfluß (ELLIS, 1982). Ferner sind nicht alle Antigene für Fische auch gleich effektive Immunogene; vor allem lösliche Proteine wie BSA (Bovines

Serumalbumin) in Freund'schem Adjuvans, parenteral appliziert, bewirken deutliche Antikörperreaktionen (HODGINS et al., 1967; AVTALION et al., 1980). Laut ELLIS (1982) gelten virale und bakterielle Mikroorganismen, sowie Säugetiererythrozyten bei Teleosteen als "gute" Antigene.

Bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) konnten trotz künstlich konstant gehaltener Umweltbedingungen von YAMAGUCHI et al. (1980) endogen verursachte, saisonale Schwankungen der Antikörperproduktion nachgewiesen werden.

III. Eigene Untersuchungen

1. Material

1.1. Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

1. KD 3784 ("Renibacterium salmoninarum")
2. KD 384 (" ")
3. ATCC 33209 (" ")
4. ATCC 14174 (*Aeromonas salmonicida*)

Die unter 1-2 aufgeführten Stämme wurden mir freundlicherweise von Dr. Evelyn und Dr. Bell, Pacific Biological Station, Nanaimo, Kanada zur Verfügung gestellt.

Für den BKD-Stamm ATCC (American Type Culture Collection) 33209 danke ich Herrn Prof. Dr. Fiedler, München. Der *Aeromonas salmonicida* Stamm ATCC 14174 wurde mir dankenswerterweise von Herr Dr. Popp, Bayrische Landesanstalt für Wasserforschung, München, überlassen.

Die BKD-Stämme wurden auf SKDM-Agar nach AUSTIN et al.(1983), KDM-2-Agar nach EVELYN (1977) und Semi-Defined-Agar nach EMBLEY et al.(1982) bei 15 - 18 °C gezüchtet. Der *Aeromonas-salmonicida*-Stamm wuchs auf Standardnährboden bei 20 °C.

Folgende Bakterienisolate wurden zur Kontrolle der Antikörperspezifität in Kaninchen- und Fischseren verwendet:

1. *E.coli*-Feldisolat Nr. 393/84 (aus Karpfen)
2. Gram-negatives, nicht näher differenziertes Feldisolat Nr. 191/83 (aus Regenbogenforelle)
3. Gram-positives, nicht näher differenziertes Feldisolat Nr. 408/83 (aus Regenbogenforelle)
4. *Pseudomonas fluorescens*-Feldisolat Nr. 86/84 (aus Regenbogenforelle)
5. *Yersinia ruckeri*-Feldisolat Nr. 157/84 (aus Regenbogenforelle)

1.2. Fische

1.2.1. Zur BKD-Diagnostik eingesandte Fische

Die untersuchten Fische stammen aus dem Untersuchungsmaterial der Jahre 1984 und 1985 des Instituts für Zoologie und Hydrobiologie der Universität München. Es handelt sich vorwiegend um Salmoniden, die entweder lebend oder tot zur Untersuchung eingesandt wurden.

1.2.2. Versuchsfische

In Infektionsversuchen wurden Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) aus eigener SPF-Haltung und Silberlachssetzlinge (*Oncorhynchus kisutch*), die nachweislich (kulturell, immunfluoreszenzserologisch) BKD-frei waren.

1.3. Fischseren

Die Fischseren für serologische Untersuchungen stammten von den lebend eingesandten Fischen, den eigenen Versuchsfischen und aus Einsendungen.

Die Seren wurden bei - 20 °C aufbewahrt.

1.4. Kaninchen

Zur Serumgewinnung wurden Kaninchen der Rasse "Weiße Neuseeländer" (weiblich, etwa einjährig) verwendet.

1.5. Sonstige Seren

Folgende Seren aus Kaninchen wurden in den serologischen Tests verwendet:

1. Kaninchen-Normalserum
2. Kaninchen-Normalserum Nr. 191-028

3. Kaninchen-Anti-KD-Serum Nr. 347
4. " " " " Nr. 80-0029
5. " " " " Nr. 96-1003
6. Kaninchen-III-Anti-KD-Serum
7. " -IV-Anti-KD-Serum

Die Seren 1, 6, 7 stammten aus eigener Herstellung. Die Seren 4 und 5 sind bei der Firma Gibco erhältlich.

Die Seren 2 und 3 wurden vom National Fish Health Research Laboratory, Kearnsville, West Virginia, U.S.A. zur Verfügung gestellt. Für die Immunofluoreszenz wurden folgende Konjugate verwendet:

1. Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat Nr. 181-022
2. Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat (Fluorescein Conjugated IgG Fraction Goat Anti-Rabbit IgG)
Nr. 1212-0081

Ersteres stammt vom National Fish Health Research Laboratory, Kearnsville, West Virginia, U.S.A., letzteres von der Firma COOPER Biomedical, Inc..

1.6. Medien und Puffer

PBS - Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	0,91 g

pH nach Bedarf auf 7,2 bzw. 7,5 einstellen.

Peptonwasser:

Bacto-Pepton	5 g
NaCl	4 g
A. dest.	ad 500 ml

Im Autoklaven bei 134 °C 10 min sterilisieren.

Glycerinpuffer:

Glycerin	8,0 ml
PBS (pH 7,5)	2,0 ml

Mit 1 N NaOH auf pH 8,5 einstellen.

Veronalpuffer (doppelt konzentriert):

Veronal-Natrium	29,428 g
Na-Azetat(3 H O)	19,428 g
HCl 1/10 N	180 ml
aqua dest.	ad 3000 ml

Auf pH 8,2 - 8,5 einstellen.

Kühl und lichtgeschützt aufbewahren und vor Gebrauch 1:2 mit A. dest. verdünnen.

Boratpuffer:

NaOH	2.0 g
Borsäure (H3BO3)	9,0 g
aqua dest.	ad 1000 ml

Auf pH 8,5 einstellen.

2. Methoden

2.1. Herstellung von Immunerum im Kaninchen

Um Antiseren herzustellen wurden zwei Kaninchen (Rasse Weiße Neuseeländer) gegen "Renibacterium salmoninarum" immunisiert. Das Antigen wurde aus auf KDM-2 kultivierten BKD-Bakterien (ATCC 33209, in PBS suspendiert, bei 5770 g zentrifugiert) gewonnen. Kaninchen III wurde mit einer Dosis von 270 mg gepackten Zellen/0,5 ml PBS i.v. in die Ohrvene, Kaninchen IV mit 250 mg gepackten Zellen/0,5 ml PBS mit Freund'schem Adjuvans versetzt i.p. injiziert. Eine zweite Injektion erfolgte in der gleichen Art und Weise nach 11 bzw. 20 Tagen. 14 bzw. 23 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen mit Narcoren^R (3 ml/kg KG i.p.) narkotisiert und durch Herzpunktion vollständig entblutet. Nach dem Abseren (4 Std. bei 4 °C) wurde das Blut zentrifugiert (bei 5290 g) und das Serum unverdünnt in Portionen von 2 bzw. 10 ml bei - 20 °C aufbewahrt, um bei Bedarf aufgetaut und entsprechend verdünnt zu werden.

2.2. Serengewinnung aus Fischen

Die lebenden Fische wurden mit MS 222^R (Tricain Methan Sulfo-nat) in 0,007 %-iger Lösung narkotisiert und das Blut mit sterilen Einmalspritzen (1-2 ml) und sterilen Einmalkanülen (0,8 x 38 mm) aus der Schwanzvene oder per Herzpunktion entnommen. Nach dem Abseren (4 Std. bei 4 °C) wurde es abzentrifugiert und das Serum in Portionen von 1 ml bei -20 °C eingefroren.

2.3. Sektion

Bei allen Fischen wurden im Zuge einer Sektion sowohl innerlich als auch äußerlich abweichende Befunde an Haut, Kiemen, Auge, der serösen Auskleidung der Körperhöhlen, der inneren Organe

(Niere, Leber, Milz, Herz, Schwimmblase), des Magen-Darm-Traktes sowie der Muskulatur erhoben.

Dabei wurden jeweils auch eine parasitologische sowie bei Verdacht eine virologische Kontrolluntersuchung durchgeführt. Zur bakteriologischen Untersuchung (Anzucht des Erregers, Immunofluoreszenz) wurden unter aseptischen Bedingungen Proben von Niere, Leber, Milz, Darm und gegebenenfalls von Haut, Auge, Herz und Muskulatur entnommen. Diese Gewebeproben wurden entweder bis zur unmittelbaren Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt oder längerfristig bei - 20 °C gelagert.

2.4. Anzucht des Erregers

Zur Anzucht wurde das Selektivmedium "SKDM" (AUSTIN et al., 1983) verwandt, das vier Antibiotika enthält, gegen die "Renibacterium salmoninarum" unempfindlich ist; damit wurde das Überwuchern des Agars durch unerwünschte Keime verhindert. Parallel dazu wurden auch Ausstriche auf Standard-Nähragar (Merck) vorgenommen.

Zur Anzucht des Erregers aus bei der Sektion entnommenen Organproben wurden diese kurz in der Bunsenbrennerflamme von ubiquitären oberflächlichen Umweltkeimen befreit. Unter sterilen Kautelen wurden von frischen Anschnittflächen mit einer Öse Abstriche auf den Nährboden vorgenommen. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde routinemäßig immer die Niere untersucht. Da laut EVELYN et al. (1981) in der Niere der Salmoniden ein löslicher, das Bakterienwachstum hemmender Faktor vorhanden ist, erforderte die Anzucht aus diesem Organ ein besonderes Vorgehen:

Die Organprobe wurde zuerst kurz in der Bunsenbrennerflamme oberflächlich entkeimt, dann in einem entsprechenden Volumen (5 ml/ g Gewebe) sterilen Peptonwassers (siehe III.1.6.) homogenisiert und zentrifugiert (bei 5770 g). Der Überstand mit dem inhibitorischen Faktor wurde verworfen. Das verbliebene Gewebs-

homogenat wurde in kaltem, sterilen Peptonwasser (1 ml/g Gewebe) resuspendiert und in sterilem, kaltem PBS von 10^{-1} bis 10^{-4} verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurde je ein Tropfen (etwa 100-200 μ l) auf den SKDM-Agar aufgetropft. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 15-18 °C im Kühlbrutschrank. Die Abstriche auf Standardnährboden wurden bei 20 °C bebrütet. Subkulturen von "*Renibacterium salmoninarum*"-Isolaten wurden auf KDM-2 (EVELYN, 1977) und Semidefined-Medium (EMBLEY et al., 1982) verimpft.

Die angezüchteten Bakterien wurden im Nativ- und Gram-Präparat beurteilt, außerdem auf biochemische Reaktionen sowie fluoreszenzserologisch untersucht.

2.5. Indirekte Immunofluoreszenz - IFAT

Die Indirekte Immunofluoreszenz wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des BKD-Bakteriums in Organmaterial und angezüchteten Bakterienkulturen eingesetzt. Die Präparate wurden auf Objektträgern für Immunofluoreszenz mit runden Testfeldern vorbereitet. Ein direkter Abklatsch von dem zu untersuchenden Organ bzw. ein direkter Abstrich von einer zu testenden Bakterienkultur wurde angefertigt. Nach dem Lufttrocknen wurden die Präparate 10 min in kaltem Aceton (- 20 °C) fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen konnten sie entweder in einem dicht verschlossenen Behälter bei - 20 °C über längere Zeit gelagert oder sofort gefärbt werden. Dabei diente eines der drei markierten Felder regelmäßig als Kontrolle, bei der statt dem nicht markierten Antiserum Kaninchennormalserum verwandt wurde. Auf den Testfeldern wurde das Antigen mit einigen Tropfen des Antiserums (Kaninchen-Anti-KD-Serum Nr. 347, Nr. 80-0029, Nr. 96-1003, Kaninchen-III und IV-Anti-KD-Serum) in entsprechend ermittelter Arbeitsverdünnung überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Das nicht gebundene Serum wurde durch dreimaliges Waschen in PBS (je 5

min) entfernt und das Präparat mit dem FITC-konjugierten Anti-Kaninchen-Serum ebenfalls in entsprechender Arbeitsverdünnung bedeckt. Nach Inkubation in der feuchten Kammer (30 min bei Raumtemperatur) wurde das überschüssige Serum erneut durch dreimaliges (je 5 min) Spülen in PBS abgewaschen. Anschließend wurden die Objektträger Glycerinpuffer und einem Deckglas eingebettet. Die so gefärbten Präparate wurden entweder sofort ausgewertet oder lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt (praktisch unbegrenzt lange haltbar).

Die Auswertung erfolgte an einem Mikroskop Dialux 20 (Leitz) mit Fluoreszenzeinrichtung (Fluoreszenzauflichtilluminator Ploemopak 2,4 (Leitz). Das UV-Licht im Bereich von 380 nm wurde von einer Quecksilberhöchstdrucklampe (Leitz HB-Lampe 50 w/ac) erzeugt. Es wurden ein Wärmeschutz-, ein Erreger- (Leitz BG 12) und ein Sperrfilter (K 510) verwendet. Mikroskopiert wurde mit Ölimmersion bei 630-facher Vergrößerung. Die Beurteilung erfolgte qualitativ-subjektiv, die Bakterienanzahl wurde mit + (einzelne Bakterien pro Gesichtsfeld), ++ (zählbare Bakterienmenge pro Gesichtsfeld), +++ (massenhaft Bakterien pro Gesichtsfeld) angegeben, ferner wurde die Qualität der Fluoreszenz mit + (schwach leuchtend), ++ (hell leuchtend), +++ (brilliant) bewertet. Unspezifische und Eigen-Fluoreszenzen des Hintergrundes wurden registriert.

In Vorversuchen wurde jede neue Antiserum- bzw. Konjugatcharge im Schachbrettmuster ausgetestet, um die jeweilig optimale Arbeitsverdünnung zu ermitteln.

Gleichzeitig wurden Kontrollen durch Färbung mit Anti-y-Globulin (FITC-konjugiertes Anti-Kaninchen-Serum) unter Weglassung der direkten Antiseren (Kaninchen-Anti-KD-Serum) durchgeführt, wobei sich bei sonst beibehaltenem Ablauf keine Fluoreszenz ergeben darf. Ferner wurden regelmäßig Negativkontrollen mit Kaninchen-Normalserum anstelle des spezifischen Antiserums aus dem Kaninchen durchgeführt.

2.6. Doppelimmunodiffusion nach Ouchterlony - DID

Die Doppelimmunodiffusion nach Ouchterlony wurde zum Nachweis von Serumantikörpern gegen "Renibacterium salmoninarum" bei Fischen und den zur Serumproduktion verwendeten Kaninchen erprobt. Die Mikromethode der DID wurde wegen des geringeren Antigen- und Antikörperverbrauchs und dem schnelleren Eintreten der Präzipitation bevorzugt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gelmedien aus Agarose, reinst (Serva) mit drei verschiedenen Puffern (siehe III.1.6.) hergestellt. Für Veronal- und Boratpuffer wurde 1,5 % Agarose, für Phosphat- und Boratpuffer wurde 1 % Agarose zu einem Gelmedium gelöst und erhitzt. Das Medium mit Phosphatpuffer wurde auf pH 8,0 eingestellt. Anschließend wurde je 0,01 % Merthiolat^R (NaN₃) zugesetzt. Die Medien konnten dann sofort verwendet oder dicht verschlossen bei 4 °C bis zu einer Woche aufbewahrt werden. Nach der gleichen Art und Weise wurde mit jedem Puffer ein 2 %-iges Gelmedium hergestellt. Als Antigen diente von einer Nährbodenplatte gewonnene Bakterienmasse, die in sterilem PBS suspendiert wurde und nach 3 x 5-minütigem Waschen und Zentrifugieren in sterilem PBS auf die Gebrauchsverdünnung (220 mg gepackte Bakterienzellen/ml Puffer) verdünnt und bei 62 °C 45 min inaktiviert wurde. Bis zur Verwendung wurde die Antigen-suspension bei 4 °C aufbewahrt. Als Antikörper dienten hitze-inaktivierte Seren von Fischen (45 °C 15 min) und als Positivkontrolle Kaninchen-Anti-KD-Serum (siehe III.1.5.). Als Negativkontrolle wurde Kaninchennormalserum (siehe III.1.5.) und Seren von BKD-freien Regenbogenforellen aus SPF-Haltung verwendet. Die Kaninchenserum wurden bei 56 °C 30 min im Wasserbad inaktiviert. Es wurde folgendermaßen verfahren: Entfettete Objektträger wurden in einer Schiene (6 Objektträger pro Schiene) auf eine ebene Unterlage gestellt und mit der angewärmten Pipette mit einer 0,5-1 mm dicken Schicht flüssigen 2 %-igem Gelmedium bedeckt. Nach dem Erstarren dieser Basisschicht wurde

das 1,0-1,5 %-ige eigentliche Gelmedium (etwa 2 mm Dicke) aufgetragen und man ließ es erkalten. Die Depotlöcher (3 mm Durchmesser, 3 mm Abstand) wurden mit Hilfe einer Plexiglas-schablone (Template, LKB) mit einem Stanzröhrchen (LKB) angebracht, wobei die Gelscheibchen über den Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurden. Das Basisgel wurde dabei möglichst nicht erfaßt. Auf jedem Objektträger konnten zwei Depotkreise mit je einem zentralen und sechs peripheren Löchern gestanzt werden. Vor dem Verwenden wurden die Objektträgergele nochmals bei 4 °C im Kühlschrank ausgehärtet. In einer feuchten Kammer (Fa. Camag) konnten sie so auch mehrere Tage gelagert werden. Die Depots wurden dann mit dem jeweiligen Reagenten in gewünschter Verdünnung beschickt (etwa 15 µl pro Loch), wobei ein Überlaufen der Löcher zu vermeiden war. Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder bei 4 °C im Kühlschrank 1-2 Tage in einer feuchten Kammer.

Die Präzipitation wurde täglich mit Beleuchtung von unten kontrolliert. Zur besseren Beurteilung wurden die Präparate gefärbt. Zu diesem Zweck mußte vorher das nicht präzipitierte Material in einem mehrfach gewechselten PBS-Bad (je nach Gel-dicke: pro mm 24 Std.) ausgewaschen werden. Die Färbung erfolgte dann nach der Trocknung des Gels. Dazu wurde die Oberfläche luftblasenfrei mit feuchtem Filterpapier bedeckt und das Medium bei 4 °C im Kühlschrank langsam oder bei 37 °C im Brutschrank schnell getrocknet. Die noch auf dem Objektträger haftenden angetrockneten Gele wurden nach GRASSET et al. (1958) gefärbt. Sie wurden 2-3 min in eine Küvette mit Färbelösung (1 g Amidoschwarz 10 B, Bayer, 500 ml 98 %-iger Methylalkohol, 400 ml A. dest., 100 ml Essigsäure) gestellt, wonach die Präzipitationslinien blau angefärbt waren. Überschüssiger Farbstoff wurde im Entfärbepad je 1-2 min in 3-4 mal gewechselter Flüssigkeit (Färbelösung ohne Amidoschwarz) entfernt.

Anschließend wurden die Gele luftgetrocknet und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei der Auswertung sowohl gefärbter als auch unbehandelter Präzipitationslinien wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

1. Qualität der Präzipitatbildung (+ schwach, ++ gut, +++ sehr gut)
2. Form und Breite der Linien (gerade, gebogen, schmal, breit, sichelmondförmig etc.)
3. Lage der Linien in Relation zu den Depots.

Zur Dokumentation wurden entweder Skizzen oder Photographien angefertigt.

2.7. Agglutination

Die Agglutinationsmethode wurde zum Nachweis von Serumantikörpern gegen BKD eingesetzt.

Als Antigen wurde eine Suspension mit abgetöteten Bakterien hergestellt. BKD-Bakterienkolonien wurden hierzu von 2-3 Wochen gebrüteten Nährbodenplatten (KDM-2) mit einer sterilen Öse geerntet und in sterilem PBS (pH 7,5) suspendiert. Die Bakterien wurden 3 x 5 min bei 5290 g zentrifugiert und gewaschen (steriles PBS) und dann auf eine durch Austesten in Verdünnungsreihen mit positivem Kontrollserum (vom Kaninchen) ermittelte Gebrauchsverdünnung (100 mg gepackte Bakterienzellen/4 ml PBS, steril, mit einer Zellzahl für ATC 33209 von $1,77 \times 10^{13}$ Zellen/ml PBS, steril) eingestellt. Anschließend wurden die Bakterien im Wasserbad bei 62 °C 45 min inaktiviert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Als "Antikörper" dienten aufgetaute oder im Kühlschrank bis zu einer Woche aufbewahrte Fischseren, die erst unmittelbar vor Versuchsbeginn inaktiviert wurden (45 °C 30 min). Positivkontrollen waren Kaninchen-Anti-KD-Seren (siehe III.1.5.), die bei 56 °C 30 min inaktiviert worden waren. Als Negativkontrollen wurden Seren von SPF-Regenbogenforellen und der BKD-freier Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) aus eigener Haltung und Kaninchen-Normalserum (siehe III.1.5.) eingesetzt.

2.7.1. Objektträgermethode

Der qualitative Objektträgerschnelltest wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf einem sauberen Objektträger wurde mit einer Pasteurpipette ein Tropfen PBS (pH 7,5) vorgelegt, um das vorzeitige Austrocknen zu verhindern. Dann wurde je ein Tropfen Antigensuspension und ein Tropfen Serum zugefügt und vorsichtig durch Schwenken vermischt. Nach 10 und 20 min wurde das Ergebnis mit bloßem Auge bzw. unter einer Lupe mit diffuser Beleuchtung vor dunklem Hintergrund bei behutsamem Schwenken des Objektträgers abgelesen. Die Intensität der Agglutination wurde mit + schwach, ++ gut +++ vollständig angegeben.

2.7.2. Mikrotitermethode

Zur quantitativen Erfassung der agglutinierenden Serumantikörper wurde der Test in einer Mikrotiterplatte (Cooke R, mit Flachboden) nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. In jedem Reaktionskompartiment wurden 30 µl steriles PBS (pH 7,5) vorgelegt und dann 30 µl des zu testenden Serums in der Platte von 1:2 bis 1:256 verdünnt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurden 30 µl der standardisierten Antigensuspension zugegeben, die Platte vorsichtig geschüttelt, mit Folie abgedeckt und zwei Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Ablesen erfolgte nach Aufbewahrung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Der Agglutinationstiter wurde als der reziproke Wert der letzten deutlich positiven Serumverdünnungsstufe angegeben. Dabei wurde Titer von 2 der Vollständigkeit halber mit berücksichtigt.

2.8. Hämagglutinationshemmungsreaktion - HAH

Die in der Virologie gebräuchliche Methode der Hämagglutinationshemmungsreaktion - HAH wurde verwendet, um hämagglutinationshemmende Serumantikörper gegen "Renibacterium salmoni-

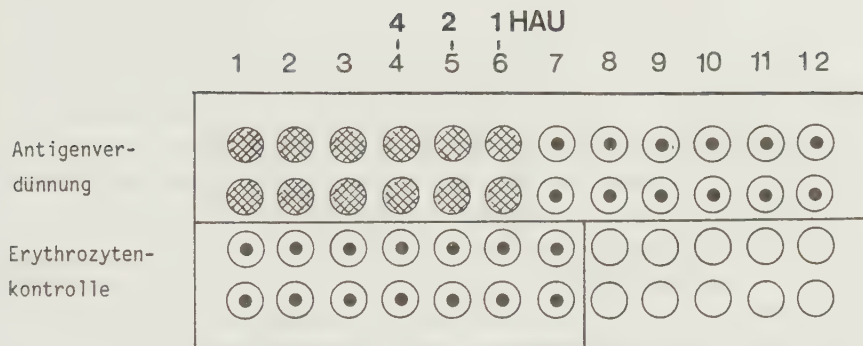
narum" in Fischseren nachzuweisen.

Bakterien des Stammes ATCC 33209 wurden von KDM-2-Platten (2 - 3 Wochen bebrütet) geerntet und in gekühltem, sterilem Peptonwasser (siehe III.1.6.) suspendiert. Diese Antigensuspension wurde ständig gekühlt (Eiswasser), aber ansonsten unbehandelt, verwendet. Vorversuche zeigten, daß Peptonwasser als Verdünnungsmedium besser geeignet ist als PBS und physiologische NaCl-Lösung. Ferner stellte sich in Vortests heraus, daß alle drei "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme (siehe III.1.1.) Schaferythrozyten (Oxoid FSR 1053) in 1 %-iger Konzentration agglutinieren. Zur Ermittlung des Hämagglutinationstiters wurde für jede neue Charge der Antigensuspension in einer Mikrotiterplatte (Rundboden) zwei Reihen von Näpfchen 1-12 mit 25 µl PBS als Vorlage beschickt. Dann wurde in das jeweils erste Näpfchen der beiden Reihen 25 µl Antigensuspension mit Hilfe von Mikrodilutern zugegeben und von 1-12 (1:2 - 1:1024) verdünnt, schließlich wurde in jedes Näpfchen 25 µl der 1 %-igen Erythrozytensuspension zugegeben. Gleichzeitig wurde eine Erythrozytenkontrolle (je 25 µl Peptonwasser, PBS und Erythrozytensuspension) angelegt, dann die Platte vorsichtig geschüttelt und bei 8 °C im Kühlschrank 10 min inkubiert. Nach vollständiger Sedimentation der Erythrozyten in der Kontrollreihe wurde der HA-Titer der Antigensuspension als 1 HAU (hämagglutinierende Einheit) in der Antigenverdünnung abgelesen, die noch vollständige Hämagglutination aufwies. Anschließend wurde die Antigensuspension mit sterilem, kaltem Peptonwasser auf eine Gebrauchsverdünnung von 4 HAU eingestellt, d.h. daß die Suspension mit dem Faktor verdünnt wurde, der sich aus dem Wert der um 2 HA-Stufen kleineren Antigenverdünnung (von 1 HAU gerechnet) ergab (siehe Abbildung 2).

Die getesteten Fischseren wurden bei 45 °C 30 min, die Kaninchenserum bei 56 °C 15 min inaktiviert. Zur Serumverdünnung wurden 25 µl PBS/Näpfchen in einer Rundbodenmikrotiterplatte vorgelegt und dann von jedem Serum (je 25 µl) mit dem

Mikrodiluter eine Verdünnungsreihe von 1:2 - 1:256 (von A-H, siehe Abbildung 3) angelegt. Dann wurde von der auf 4 HAU eingestellten Antigensuspension in jedes Nöpfchen 25 μ l zugefügt. Die Reihe A diente der Serumkontrolle und wurde nicht mit dem Antigen, sondern mit Peptonwasser, dem Antigenverdünnungsmedium, beschickt. Nach vorsichtigem Schütteln wurde die Platte zur Antigen-Antikörper-Bindung 10 min bei 8 °C im Kühlschrank inkubiert. Nach erfolgter Bindung wurde die 1 %-ige Schaferythrozytensuspension (je 25 μ l) in alle Nöpfchen also auch in der Serumkontrolle zugegeben. Die Serumkontrolle enthält die Serumverdünnung und Peptonwasser sowie die Erythrozytensuspension. Sie soll die Anwesenheit unspezifischer Agglutinine gegen die Erythrozyten im Serum anzeigen. Die Erythrozyten- und Antigenkontrollen wurden parallel zu jeder Versuchsreihe auf einer gesonderten Kontrollplatte durchgeführt. Die Erythrozytenkontrolle diente als Negativkontrolle, d.h. als Test für die Normalsedimentation der roten Blutkörperchen. Sie enthält je 25 μ l PBS, Peptonwasser und Erythrozytensuspension. Mit der Antigenkontrolle wurde die hämagglutinierende Aktivität und die Stabilität der Bakteriengebrauchssuspension überprüft. Dazu wurden in einer Reihe auf der Kontrollplatte eine Antigenverdünnung dieser Suspension, 25 μ l von 1:2 - 1:16 in 25 μ l PBS als Vorlage mit dem Mikrodiluter angelegt und je 25 μ l 1 %-ige Erythrozytensuspension zugegeben. Die Platten wurden vorsichtig geschüttelt und bei 20 °C 1-3 Std. inkubiert.

Abgelesen wurde mit bloßem Auge vor hellem Hintergrund nach vollständiger Sedimentation der Erythrozyten in der Kontrolle. Sowohl Serum- als auch Erythrozytenkontrolle müssen den "Erythrozytenknopf", also keine Hämagglutination, aufweisen. Die Antigenkontrolle muß bei 1:4 Agglutination der Erythrozyten zeigen. Als HAH-Titer wurde der reziproke Wert der Serumverdünnungsstufe angegeben, bei der noch eine vollständige Hemmung der Hämagglutination ("Erythrozytenknopf") auftritt. Aus technischen Gründen konnten erst Titer ab 4 abgelesen werden.



- HAU : Hämaglutinierende Einheit
 ● : Erythrozytenknopf
 : vollständige Hämaglutination
 1 - 12 : Verdünnungsreihe 1 : 2 bis 1 : 4168

Abbildung 2 : Beispiel für die Antigentitration im HAH-Test

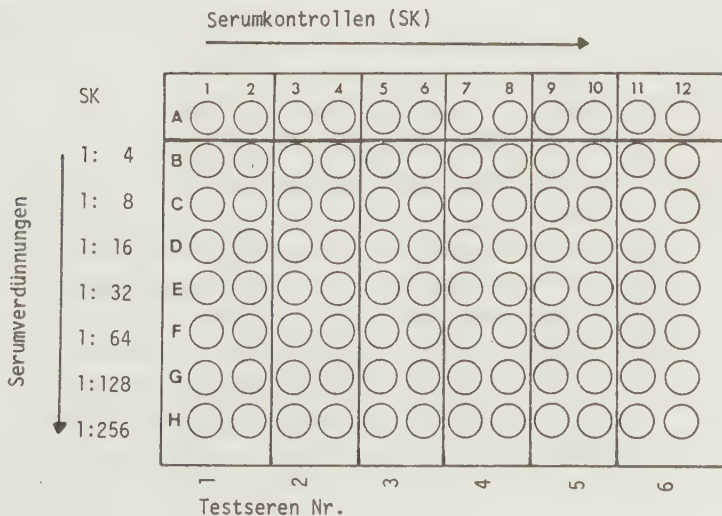


Abbildung 3 : Einteilung der Testplatte für die HAH-Reaktion

3. Infektionsversuche

Um die Pathogenität der verwendeten BKD-Stämme zu testen und damit dem Koch'schen Postulat gerecht zu werden, wurden mit jedem Stamm ein Infektionsversuch an lebenden Fischen durchgeführt. Ferner wurde dadurch BKD-positives Vergleichsmaterial (Organe und Serum) beschafft und der Verlauf der Krankheit beobachtet.

3.1. Versuchsbedingungen

Die Versuchsfische wurden in gut durchlüfteten Glasaquarien mit 120 l Fassungsvermögen gehalten, in die sie eine Woche Versuchsbeginn umgesetzt wurden, um sich an die veränderten Bedingungen akklimatisieren zu können. Die Wasserversorgung erfolgte im Durchflußsystem (2 l/min). Es wurde Münchener Leitungswasser mit einem Härtegrad von 16,4 °dH und einer Temperatur von 12 +/- 1 °C verwandt, das über eine Entchlörungsanlage geleitet worden war. Gefüttert wurde handelsübliches, pelletiertes Regenbogenforellenalleinfutter.

3.2. Infektionsart und -dosis

Die Bakterien wurden von 2-3 Wochen bebrüteten KDM-2- bzw. Semi-defined-Nährbodenplatten geerntet, in sterilem PBS suspendiert, zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das gepackte Zellsediment erneut in PBS (steril, pH 7,5) suspendiert und auf die jeweilige Gebrauchsdosis eingestellt. Die Zellzahl wurde in einer Zählkammer mit Einteilung nach Neubauer festgestellt. Die Fische wurden einen Tag nicht gefüttert und dann mit MS 222^R (Tricain Methan Sulfonat) in 0,007 %-iger Badebehandlung narkotisiert, i.p. zwischen die Bauchflossen injiziert und entsprechend an den Flossen (mit Scherenschlag) markiert. Mit den Kontrolltieren wurde auf die gleiche Weise verfahren, die Injektionsdosis enthielt jedoch nur gleiche Volumina PBS.

3.3. Versuchsansätze

Folgende Infektionsversuche wurden durchgeführt:

Versuch 1:

Bakterium: ATCC 33209 (von Semi-defined-Nährboden)

Dosis: 0,1 ml/Fisch einer Suspension mit $8,61 \times 10^{12}$
Zellen/ ml sterilem PBS

Fische: 12 Silberlachse (*Oncorhynchus kisutch*)

Größe: 11-20 cm, Durchschnitt 12,7 cm

Gewicht: 13-28 g, " 16,5 g

davon: 10 infizierte (markiert)

2 nicht infizierte

Infizierte und nicht infizierte Fische wurden in verschiedenen Aquarien gehältert.

Versuch 2:

Bakterium: KD 384 (KDM-2-Nährboden)

Dosis: 1. Injektion 0,2 ml/Fisch einer Suspension mit
 $3,54 \times 10^{12}$ Zellen/ml
sterilem PBS

2. Injektion (im Abstand von 21 Tagen)

0,2 ml/Fisch einer Suspension mit
 $1,84 \times 10^{14}$ Zellen/ml
sterilem PBS

Fische: 12 SPF-Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Größe: 19-24 cm, Durchschnitt 21,4 cm

Gewicht: 86-141 g, " 116,9 g

davon 10 infizierte

2 nicht infizierte

Die Kontrolltiere wurden in einem separaten Aquarium gehältert.

Versuch 3:

Bakterium: KD 3784 (von KDM-2-Nährboden)

Dosis: 0,1 ml/Fisch einer Suspension mit $3,43 \times 10^{10}$
Zellen/ml sterilem PBS

Fische: 25 Silberlachse (O. kisutch)

Größe: 11-14 cm, Durchschnitt 12,6 cm

Gewicht: 11-26 g, Durchschnitt 18,8 g

davon 15 infizierte (markiert)

10 nicht infizierte

Fünf der nicht infizierten Kontrolltiere wurden im selben Becken wie die infizierten, die anderen fünf separat in einem Aquarium gehalten.

3.4. Versuchsablauf und vorgenommene Untersuchungen

Die Fische wurden täglich auf äußerliche Krankheitsmerkmale hin kontrolliert, akut gestorbene Exemplare wurden abgesammelt und schwere Krankheitssymptome aufweisende Fische durch MS 222^R getötet. Sie wurden entweder sofort aufgearbeitet oder bis zur Untersuchung bei - 20 °C aufbewahrt.

Im Rahmen der Untersuchung wurden die Zeit von Infektion bis zum Tod, Zustand der Fische (frisch getötet, gefroren, autolytisch) und die Markierung registriert. Bei der Sektion wurden pathologische Befunde erhoben, besonders auffällige und charakteristische Veränderungen wurden auch photographisch dokumentiert. Ferner wurden unter aseptischen Bedingungen Proben zu kulturellen Anzucht (Niere) und für die Immunofluoreszenz (Niere, Leber, Milz, Darm). Bei ausreichender Größe wurde bei frisch getöteten Fischen auch eine Blutprobe zur Serumgewinnung für serologische Untersuchungen gewonnen.

4. Ergebnisse

4.1. Kaninchen-Antiseren

4.1.1. Kaninchen-Antiseren in der Indirekten Immunfluoreszenz - IFAT

Die unter III.1.4. und III.1.5. genannten Anti-KD-Seren und FITC-Konjugate wurden auf ihre Antikörperspezifität und auf ihre Eignung für die indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. In Vorversuchen waren geeigneten Arbeitsverdünnungen der jeweiligen Seren durch Titration im Schachbrettmuster mit "Renibacterium salmoninarum" ermittelt worden.

Mit Ausnahme von III (1:80 in PBS verdünnt) wurden alle Kaninchen-Anti-KD-Seren 1:40 und die Kaninchennormalseren 1:40 bzw. 1:80 verdünnt. Das Kaninchen-FITC-Konjugat Nr.181-022 wurde 1:40, das mit Nr.1212-0081 1:200 verdünnt.

Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß die Kaninchen-Anti-KD-Seren in geeigneter Arbeitsverdünnung gleich gute Fluoreszenzergebnisse mit den "Renibacterium salmoninarum"-Stämmen erbringen. Es liegen keine Kreuzreaktionen mit den sonstigen getesteten Bakterien bzw. unspezifische Reaktionen der Bakterien mit den Konjugaten oder den Kaninchennormalseren vor. Die Kaninchen-Anti-KD-Seren III und IV besitzen somit in der IFAT spezifisch reagierende Antikörper gegen " Renibacterium salmoninarum".

Tabelle 6: Spezifikationskontrolle der in der IFAT verwendeten Antiseren mit Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat Nr. 191-022 *

Bakterien	Kaninchen-Anti-KD-Seren					Negativkontrolle				
	Nr. 347	Nr. 80-0029	Nr. 96-1003	III	IV	KNS (eigen)	KNS Nr. 191-028	Konjugat **		
ATCC 33209	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅
KD 384	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅
KD 3784	+++	+++	+++	+++	+++	∅	∅	∅	∅	∅
ATCC 14174	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Yersinia ruckeri- Feldisolat Nr. 157/84	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Gram-negatives *** Feldisolat Nr. 191/83	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Pseudomonas fluo- rescens-Feldisolat Nr. 86/84	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Gram-positives *** Feldisolat Nr. 408/83	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

* - bei Verwendung von Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat Nr. 1212-0081 ergaben sich identische Resultate

** - Färbung mit Anti-Kaninchen-FITC-Konjugat, ohne Verwendung von Antiserum

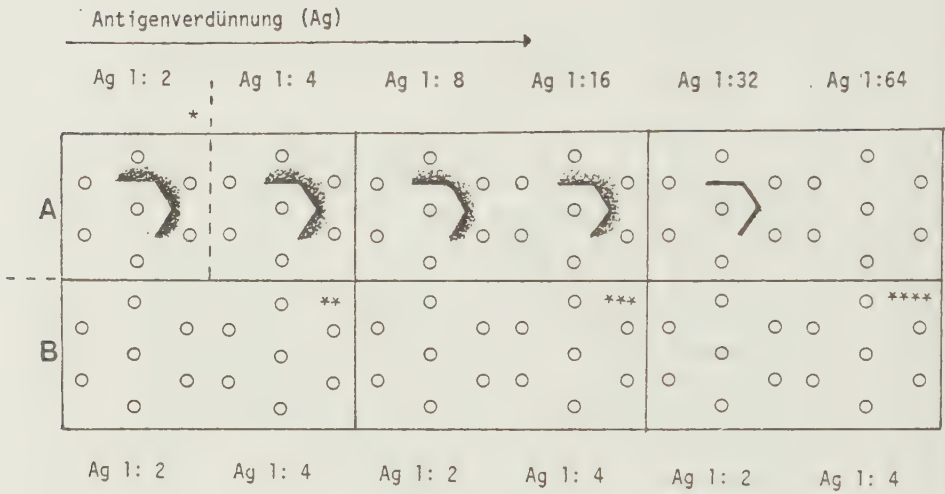
*** - nicht näher differenziert

Zeichenerklärung : ∅ - negativ

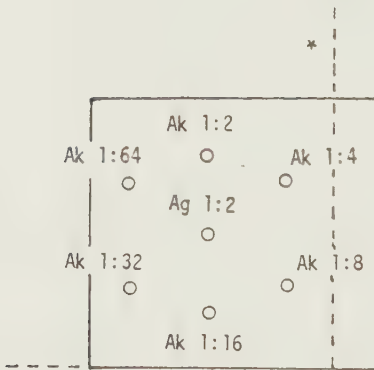
+++ - sehr gute Fluoreszenz

4.1.2. Nachweis von spezifischen, präzipitierenden Antikörpern durch Doppelimmunodiffusion (DID) in den Kaninchen-Anti-KD-Seren

Mit der als Mikromethode durchgeführten Doppelimmunodiffusion (DID) wurden die Kaninchen-Anti-KD-Seren auf spezifische, präzipitierende Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" untersucht. Vortests ergaben, daß Veronalpuffer-Agarose-Medium als einziges für den Antikörpernachweis geeignet war. Um die jeweiligen Antikörpertiter im Kaninchenserum und die optimale Antigengebrauchsverdünnung zur Erreichung deutlicher Präzipitationslinien zu ermitteln, wurden alle Kaninchen-Anti-KD-Seren gegen alle "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme getestet. Als Negativkontrolle dienten Kaninchennormalseren und die Verdünnungspuffer. Dabei wurde Serum (Verdünnungen 1:1, 1:2 - 1:32) gegen Antigen (Verdünnungen 1:2 - 1:64) titriert. Ein Beispiel für ein Präzipitationsergebnis ist in Abbildung 4 dargestellt und die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.



- A - Testserum
- B - Kontrollserum
- ** - Kaninchennormalserum
(siehe III.1.5.)
- *** - Kaninchennormalserum Nr.191-028
- **** - Pufferlösung zur Verdünnung
(PBS, pH 7,5)



* - Ausschnitt: Anordnung der Serumverdünnungen

Abbildung 4: DID-Mikromethode - Präzipitationsreaktion des Kaninchen-Anti-KD-Serums (III) mit "Renibacterium salmoninarum"

Tabelle 7: Präzipitationstiter der Kaninchen-Anti-KD-Seren in der Doppelimmunodiffusion (DID) nach der Mikromethode

	"Renibacterium salmoninarum"-Stämme		
	ATCC 33209 (1:2 - 1:64)*	KD 384 (1:2 - 1:64)*	KD 3784 (1:2-1:64)*
Kaninchen-Anti-KD-Seren			
Nr. 347	1:2** / 1:2-1:32***	1:2 / 1:2-1:32	1:2 / 1:2-1:32
Nr. 80-0029	1:2 / 1:2-1:32	1:2 / 1:2-1:32	1:2 / 1:2-1:32
Nr. 96-1003	1:2 / 1:2-1:32	1:2 / 1:2-1:32	1:2 / 1:2-1:32
III	1:4 / 1:2-1:32	1:4 / 1:2-1:32	1:4 / 1:2-1:32
IV	1:4 / 1:2-1:32	1:4 / 1:2-1:32	1:4 / 1:2-1:32
III a (vor Boosterung)	Ø	Ø	Ø
IV a (vor Boosterung)	Ø	Ø	Ø
Kontrollseren (Kaninchennormalseren)			
KNS (eigen)	Ø	Ø	Ø
KNS Nr.191-028	Ø	Ø	Ø

* - Getestete Antigenverdünungen

** - Präzipitationstiter des Serums

*** - Antigenverdünungen mit positiver Reaktion

Ø - negativ

Um die Spezifität der präzipitierenden Antikörper bzw. Kreuzreaktionen der Kaninchen-Anti-KD-Seren zu überprüfen, wurden die jeweiligen Seren gegen eine Reihe von Bakterien getestet, aus denen wie in III.2.6. beschrieben ebenfalls Antigensuspensionen hergestellt worden waren. Das Ergebnis des Versuchs (siehe III.2.6.) ist in Abbildung 4 dargestellt. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Spezifitätsuntersuchung aufgelistet.

Aus Tabelle 7 geht hervor, daß bei der verwandten Konzentration der Antigensuspension Verdünnungen bis 1:32 positive Reaktionen mit den Antiseren ergaben. Optimale Präzipitationslinien (gerade, deutlich ausgeprägte Linien, in der Mitte zwischen den Depots liegend) erbrachte die Antigenverdünnungsstufe 1:32. Bei höheren Konzentrationen der Bakterien waren verbreiterte, unklare Präzipitationslinien zu beobachten. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ergaben sich bei allen Kaninchen-AntiKD-Seren positive Reaktionen, es wurden also präzipitierende Antikörper gegen alle "Renibacterium salmoninarum"-Stämme nachgewiesen. Die Kaninchen-Anti-KD-Seren III und IV zeigten eine um eine 2-er Potenz höhere Titerstufe als die anderen Antiseren. Vor der 2. Immunisierungsinjektion (Boosterung) zeigten beide noch keinen bzw. noch keinen mit dieser Methode nachweisbaren Titer präzipitierender Antikörper. Die Kaninchennormalseren dienten als Negativkontrolle für Kreuzreaktionen zwischen Kaninchenserum und Bakterien. Aus Tabelle 8 läßt sich entnehmen, daß die Reaktion der Antiseren mit den verwandten "Renibacterium salmoninarum"-Stämmen einen hohen Grad an Spezifität aufweist. Mit keinem der anderen getesteten Bakterienstämmen bzw. -isolaten konnte die Ausbildung von Präzipitaten, also eine Kreuzreaktion beobachtet werden.

Tabelle 8: Ergebnisse der Spezifitätsüberprüfung der Antisera gegen "Renibacterium salmoninarum"

Bakterien	Kaninchen-Anti-KD-Seren					Kaninchennormalseren (Kontrolle)	
	Nr.347	Nr.80-0029	Nr.96-1003	III	IV	KNS (eigen)	KNS Nr.191-028
ATCC 33209*	+	+	+	+	+	Ø	Ø
KD 384*	+	+	+	+	+	Ø	Ø
KD 3784*	+	+	+	+	+	Ø	Ø
ATCC 14174 ¹	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr.86/84 ²	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr.408/83 ³	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr.191/83 ⁴	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr.157/84 ⁵	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr.392/84 ⁶	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

* - "Renibacterium salmoninarum"-Stamm

1 - Aeromonas salmonicida-Stamm ATCC 14174

2 - Pseudomonas fluorescens-Feldisolat (aus Regenbogenforelle)
Nr. 86/84

3 - nicht genauer differenziertes, gram-positives Feldisolat
(aus Regenbogenforelle) Nr. 408/83

4 - nicht genauer differenziertes, gram-negatives Feldisolat
(aus Regenbogenforelle) Nr. 191/83

5 - Yersinia ruckeri-Feldisolat (aus Regenbogenforelle)
Nr. 157/84

6 - E.coli-Feldisolat (aus Karpfen) Nr. 392/84

Zeichenerklärung: + - Präzipitationsreaktion

Ø - keine "

4.1.3. Nachweis spezifischer agglutinierender Antikörper gegen "Renibacterium salmoninarum" in den Kaninchen-Anti-KD-Seren

Um spezifische agglutinierende Antikörper gegen "Renibacterium salmoninarum" in den Kaninchen-Anti-KD-Seren nachzuweisen, wurde die Objektträgermethode verwandt. Das Ergebnis dieses Spezifitätsversuchs ist in Tabelle 10 zu finden. Um die Agglutinititerhöhe der Kaninchen-Anti-KD-Seren zu ermitteln, wurde die Mikromethode eingesetzt. Da die Reaktionen zwischen allen Kaninchen-Anti-KD-Seren und "Renibacterium salmoninarum"-Stämmen qualitativ (Tabelle 10) in gleicher Intensität erfolgten, wurden für die Bestimmung der Titerhöhe nur der ATCC 33209-Stamm und als Negativkontrolle das laboreigene Kaninchennormalserum verwandt. Das Ergebnis ist in folgender Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Agglutininintiterhöhe der Kaninchen-Anti-KD-Seren

Kaninchenserum (inaktiviert)	Antigen ¹
Kaninchen-Anti-KD-Serum III	256
" IV	256
" Nr. 80-0029	64
" Nr. 96-1003	64
" Nr. 357	160

¹ - "Renibacterium salmoninarum"-Stamm ATCC 33209 (siehe III.2.7.)

Tabelle 10: Qualitativer Nachweis von agglutinierenden Anti-
körpern gegen "Renibacterium salmoninarum" in den
Kaninchen-Anti-KD-Seren

Bakterien	Kaninchen-Anti-KD-Seren					Kaninchennormalseren (Kontrolle)	
	Nr. 347	Nr. 80-0029	Nr. 96-1003	III	IV	KNS (eigen)	KNS Nr. 191-028
ATCC 33209*	+++	+++	+++	+++	+++	Ø	Ø
KD 384*	+++	+++	+++	+++	+++	Ø	Ø
KD 3784*	+++	+++	+++	+++	+++	Ø	Ø
ATCC 14174 1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr. 157/84 2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr. 191/84 3	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr. 408/83 4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr. 86/84 5	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Nr. 392/84 6	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

* - "Renibacterium salmoninarum"-Stamm

1 - Aeromonas salmonicida-Stamm

2 - Yersinia ruckeri-Feldisolat (aus Regenbogenforelle)
Nr. 157/84

3 - nicht differenziertes, gram-negatives Feldisolat (aus
Regenbogenforelle) Nr. 191/83

4 - nicht differenziertes, gram-positives Feldisolat (aus
Regenbogenforelle) Nr. 408/83

5 - Pseudomonas fluorescens-Feldisolat (aus Regenbogenforel-
le) Nr. 86/84

6 - E.coli-Feldisolat (aus Karpfen) Nr. 392/84

Zeichenerklärung: Intensität der Reaktion

Ø - keine Agglutination

+++ - vollständige Agglutination

Aus Tabelle 10 geht hervor, daß die "Renibacterium salmoninarum"-Stämme in gleicher Weise mit allen BKD-Antiseren reagieren. Es bestehen qualitativ keine Unterschiede in der Agglutination zwischen den Kreuzreaktionen der Seren mit den anderen getesteten Bakterien liegen nicht vor, woraus ein hoher Spezifitätsgrad der agglutinierenden Antikörper resultiert.

4.1.4. Untersuchung der Kaninchen-Antiseren auf hämagglutinationshemmende Antikörper gegen "Renibacterium salmoninarum"

Die Untersuchung der Kaninchen-Antiseren auf spezifische hämagglutinationshemmende Antikörper gegen die "Renibacterium salmoninarum"-Stämme (siehe III.1.1.) wurde nach der in III.2.8. beschriebenen Methode durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Aus dieser ist ersichtlich, daß die Kaninchennormalseren (inaktiviert) keine hämagglutinationshemmenden Eigenschaften besitzen. Von den BKD-Antiseren besitzen zwei (IV und Nr.347) ebenso keine derartigen Eigenschaften, also entsprechende Antikörper. Kaninchen III, Nr. 96-1003 und Nr. 80-0029 hingegen weisen vergleichbare HAH-Titer auf.

Tabelle 11: Titerbestimmung von hämagglutinationshemmenden
Antikörpern der Kaninchen-Anti-KD-Seren

Kaninchen-Anti-KD-Seren	HAH-Titer
III	8/16
IV	0
Nr. 347	0
Nr. 96-1003	16/32
Nr. 80-0029	8
Kontrollen	
Kaninchennormalserum (eigenes)	0
" Nr. 191-028	0

4.2. Infektionsversuche

Die Ergebnisse der Infektionsversuche sind in den Tabellen 12, 13 und 14 dargestellt.

In Infektionsversuch 1 (Tabelle 12) wurden fünf der infizierten Fische klinisch krank und starben oder wurden aus tierschützerischen Gründen getötet. Die Zeit von Infektion bis zum Tod betrug 22 - 36 Tage, im Durchschnitt 28,7 Tage.

Die Veränderungen entsprachen den unter II.2.4. aufgelisteten pathologisch-anatomischen Symptomen. Vier der infizierten Fische zeigten keine pathologisch-anatomischen Veränderungen. Von einem gestorbenen Fisch konnte wegen starker Autolyse nur noch eine fluoreszenzserologische Untersuchung der Niere vorgenommen werden. Die Kontrolltiere wurden nach 42 Tagen getötet und waren bei allen Untersuchungen BKD-frei. Mit Ausnahme von Nr.5 (Autolyse) konnten bei allen das Bakterium rückisoliert werden. Durch IFAT konnte das Bakterium bei klinisch erkrankten Fischen und inapparenten "Carriern" in den Organen Niere, Milz, Leber, Darm und Herz meist in großer bis sehr großer Zahl nachgewiesen werden. Bei vier Fischen wurde das Serum auf agglutinierende Antikörper hin untersucht, wobei zwei positive (Titer 64) und zwei negative Reagenten festgestellt wurden. Die Untersuchung auf hämagglutinationshemmende Antikörper bei diesen Fischen verlief negativ.

Im Verlauf des Infektionsversuchs 2 (Tabelle 13) erkrankten und starben die infizierten Fische ab dem 29. bis zum 43. Tag nach der 1. Infektion, im Durchschnitt nach 39,5 Tagen. Davon wurden vier Fische schwer erkrankt vorzeitig getötet. Ein Fisch überlebte die Infektion und wurde nach 70 Tagen zusammen mit den Kontrolltieren getötet. Die Kontrollfische erwiesen sich bei allen Untersuchungen als negativ in Bezug auf BKD und zeigten auch keine Antikörpertiter.

Tabelle 12: Infektionsversuch 1 mit "Renibacterium salmoninarum"-Stamm ATCC 33209 an Silberlachsen (Oncorhynchus kisutch)

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht 1	IFAT 2	Serumuntersuchung Agglutination 3	HAH-Test 4
1	22	frisch gestorben	o.B. 5	+	Ni, Mz +++	-	-
2	23	frisch gestorben	o.B.	+	Ni, Mz ++	-	-
3	26	frisch gestorben	Blutungen im Magen-Darm-Trakt	+	Ni, Mz +++	-	-
4	29	frisch gestorben	Abdomenschwellung, Aszites, grauweiße Verfärbungen der Niere, Blutungen im Magen-Darm-Trakt	+	Ni, Mz +++	ø / 0	0
5	29	gestorben, autolytisch	- 6	ø	Ni +++	-	-
6	30	frisch getötet	o.B.	+	Ni, Mz, Le +	ø / 0	0
7	30	frisch gestorben	grauweiße Verfärbungen der Niere	+	Ni +++	-	-
8	30	frisch getötet	o.B.	+	Ni, Mz, Le, HZ +++	++ / 64	0
9	32	gestorben, geringgradig autolytisch	grauweiße Verfärbungen der Niere	+	Ni, Mz +++ Le +	-	-
10	33	frisch getötet	Abdomenschwellung, Aszites, Beläge auf der Schwimmblase, grauweiße Verfärbungen der Niere	+	Ni, Mz, Da +++	++ / 64	0

Fortsetzung Tabelle 12:

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht ¹	IFAT ²	Serumuntersuchung Agglutination ³	HAH-Test ⁴
Kontrollfische (separat gehalten)							
11	42	frisch getötet	o.B.	Ø	Ni, Mz, Le, Da Ø	Ø / 0	0
12	42	frisch getötet	o.B.	Ø	Ni, Mz, Le, Da Ø	Ø / 0	0

- 1 - Anzucht des Bakteriums aus der Niere, durch IFAT am Kulturabstrich bestätigt
- 2 - Bakteriennachweis durch IFAT in Organen (Ni - Niere, Mz - Milz, Le - Leber, Da - Darm, Hz - Herz; Ø - keine, + - einzelne, ++ - noch zählbare, +++ - massenhaft Bakterien pro Gesichtsfeld)
- 3 - Agglutination: qualitativ (Ø - keine, + - schwache, ++ - gute, +++ - vollständige Agglutination)/ quantitativ (Agglutinations-Titer, als reziproker Wert der letzten positiven Serumverdünnungsstufe)
- 4 - HAH-Titer: reziproker Wert der letzten positiven Serumverdünnungsstufe
- 5 - o.B. - ohne Besonderheiten
- 6 - - nicht untersucht

Tabelle 13: Infektionsversuch 2 mit "Renibacterium salmoninarum"-Stamm KD 384 an Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht 1	IFAT 2	Serumuntersuchung Agglutination 3	HAH-Test 4
1	29	gestorben, gefroren	Hautblutungen (an Flossenbasen), Milz- und Nierenschwellung, blutig-seröser Aszites	+	Ni, Le, Da +++ Mz ++	- *	-
2	38	frisch gestorben	Abdomenschwellung, Blutungen (innere Organe und Muskulatur), Nierenschwellung, weißliche Beläge auf der Schwimmblase	+	Ni, Mz, Le +++ Da +	-	-
3	39	frisch gestorben	Blutungen (Magen-Darm-Trakt, Muskulatur, Leber), Leber- und Milzschwellung, weißliche Beläge auf der Schwimmblase	+	Ni, Da, Mz +++ Le ++	-	-
4	39	frisch getötet	Hautblutungen und -ulzera, Milz-, Nieren- und Leberschwellung, blutig-seröser Aszites, Blutungen im Magen-Darm-Trakt, weißliche Beläge auf Milz und Schwimmblase	+	Ni, Mz, Da ++ Le +++	o / o	0
5	42	frisch getötet	Abdomenschwellung, Blutungen (in Magen-Darm-Trakt und Muskulatur), Milz (Schwellung und weißliche Beläge), Leber (Schwellung und Blutungen), grauweiße Verfärbungen der Niere	+	Ni, Mz, Le +++ Da +	o / o	0

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht 1 IFAT 2	Serumuntersuchung Agglutination 3	HAH-Test 4
6	42	frisch getötet	Exophthalmus (beidseitig), Abdomenschwellung, Aszites, weißlich-blutige Beläge auf der Schwimmblase, Blutungen im Magen-Darm-Trakt, Nieren-, Milz- und Leberschwellung, herdförmige, weißliche Verfärbungen der Milz	+ Le, Da +++ Ni, Mz +	++ / 64	4
7	42	frisch getötet	Exophthalmus (linksseitig)	+ Ni +++ Mz, Le, Da +	♂ / 0	8
8	42	frisch getötet	Abdomenschwellung, Exophthalmus (beidseitig), Aszites, Blutungen (in Muskulatur, an Schwimmblase), Milz (Schwellung, weißliche Beläge), Leber (Schwellung, brüchige Konsistenz), Niere (grauweißlich granuliert, geschwollen)	+ Ni, Mz, Le +++ Da +	+++ / 32	0
9	43	frisch gestorben	Blutungen (Muskulatur, Magen-Darm-Trakt), Milz-, Leber- und Nierenschwellung, grauweißliche Verfärbungen der Niere	+ Ni, Mz, Da ++ Le +++	-	-
10	70	frisch getötet	o.B. 3	+ Ni ++ Le, Mz, Da ♂	♂ / 0	0
Kontrollfische (separat gehalten)						
11	70	frisch getötet	o.B.	♂ Ni, Mz, Le, Da ♂	♂ / 0	0
12	70	frisch getötet	o.B.	♂ Ni, Mz, Le, Da ♂	♂ / 0	0

Fortsetzung Tabelle 13:

- * - - nicht untersucht
- 1 - Bakterienanzucht aus der Niere, durch IFAT bestätigt
- 2 - Bakteriennachweis in Organen (Ni - Niere, Mz - Milz, Le - Leber, Da - Darm; Ø - keine, + - einzelne, ++ - zählbare, +++ - massenhaft Bakterien/Gesichtsfeld)
- 3 - o.B. - ohne Besonderheiten
- 4 - Ø - negativ
- 5 - Agglutination: qualitativ (Ø - keine, + - schwache, ++ - gute, +++ - vollständige Agglutination) / quantitativ (Agglutinationstiter)
- 6 - HAH-Titer (reziproker Wert der letzten positiven Serumverdünnungsstufe)

Mit Ausnahme von einer (Nr.10), waren alle Forellen klinisch erkrankt und bei allen Infizierten konnte das Bakterium aus der Niere rückisoliert und am Kulturabstrich durch Immunofluoreszenz bestätigt werden. In allen untersuchten Organen (Niere, Milz, Leber, Darm) wurden meist sehr große Mengen von BKD-Bakterien nachgewiesen. Lediglich ein klinisch unauffälliger Fisch (Nr.10) wies nur in der Niere immunofluoreszenzserologisch BKD-Bakterien auf; Leber, Milz und Darm hingegen waren negativ. Von den sechs infizierten Fischen, die auf Antikörper hin untersucht worden waren, besaßen zwei (Nr. 6 und 8) positive Agglutinationstiter von 32 und 64 und zwei (Nr. 7 und 6) positive HAH-Titer von 8 und 4, wobei ein Fisch (Nr. 6) Agglutinations- und HAH-Titer aufwiesen, einer (Nr. 7) besaß nur einen HAH-Titer (von 8) und ein Fisch (Nr.8) hatte nur einen Agglutinationstiter von 32.

Im Infektionsversuch 3 (Tabelle 14) waren zum Zeitpunkt des Todes 7 klinisch unauffällige und 8 klinisch erkrankte Silberlachse zu verzeichnen. Die Dauer von Infektion bis zum Tod betrug zwischen 12 und 25 Tagen, im Durchschnitt 17,9 Tage. Nach 70 Tagen wurden die nicht infizierten Beisitzer und die separat gehaltenen Kontrollfische getötet.

Die Kontrollfische waren bei allen Untersuchungen auf BKD hin negativ, Serumantikörper konnten weder mit der Agglutinationsmethode noch im Hämagglutinationshemmungstest nachgewiesen werden. Die nicht infizierten Beisitzer wiesen geringgradige pathologisch-anatomische Veränderungen (Milz- und Nierenschwellung) auf. Aus der Niere konnte bei diesen Fischen in allen Fällen das BKD-Bakterium rückisoliert werden. Durch IFAT wurden in der Niere (bei einem Fall in der Leber) geringe Mengen an "*Renibacterium salmoninarum*" gefunden. Auf Antikörper waren die Beisitzer nicht getestet worden. Im gemeinsamen Aquarium erfolgte also eine Infektion der Beisitzer mit BKD-Bakterien.

Tabelle 14: Infektionsversuch 3 mit dem "Renibacterium salmoninarum"-Stamm KD 3784 an Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*)

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht ¹ IFAT ²
1	12	gestorben, tiefgefroren	Blutungen der inneren Organe, grau-weiße Verfärbungen der Niere	+ Ni, Mz, Le, Da +++
2	12	gestorben, tiefgefroren	o.B. ³	+ Ni, Mz, Le, Da +++
3	14	gestorben, tiefgefroren	Abdomenschwellung, Blutungen im Magen-Darm-Trakt	+ Ni, Le, Da +++ Mz +
4	14	gestorben, tiefgefroren	Hautblutungen (an Flossenbasen), Aszites, weißlich getriebte Schwimmblase	+ Le, Da +++ Mz + Ni ♂
5	17	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Ni, Mz, Da +++ Le +
6	17	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Ni, Mz, Le, Da +++
7	17	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Ni, Mz, Le, Da +++
8	17	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Ni, Mz, Le, Da +++
9	18	gestorben, tiefgefroren	Blutungen im Magen-Darm-Trakt, blutiger seröser Aszites	+ Ni +++ Da ++ Mz, Le +

Fortsetzung Tabelle 14:

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart	pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht IFAT
10	18	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Le, Da +++ Ni ++ Mz +
11	20	gestorben, tiefgefroren	o.B.	+ Ni ++ Le, Da +++ Mz +
12	20	frisch getötet	Blutungen in Muskulatur, hämorrhagischer Aszites, Milzschwellung, Leber (bruchige Konsistenz, fleckig verfärbt), weißliche Beläge auf Schwimmblase, Hautblutungen (an Flossenbasen, Körperseiten)	+ Ni, Le, Da +++ Mz ++
13	23	frisch gestorben	Hautblutungen (Körperseiten), Blutungen im Magen-Darm-Trakt, weißliche Beläge auf Schwimmblase, Leberblutungen	+ Ni +++
14	24	frisch gestorben	Hautblutungen (Flossenansatz), Blutungen (Magen-Darm-Trakt, Leber), weißlich getrübbte Schwimmblase, Leber blaß	+ Ni, Mz, Le, Da +++
15	25	frisch gestorben	Leber (blaß mit Blutungen)	+ Ni, Mz, Le, Da +++

Fortsetzung Tabelle 14:

Fisch	Zeit von Infektion bis zum Tod (in Tagen)	Zustand und Todesart pathologisch-anatomischer Befund	Bakteriennachweis Anzucht IFAT
Beisitzer (nicht infiziert)			
16	70	frisch getötet Nierenschwellung	+ Ni ++ Le,Mz,Da ♂
17	70	frisch getötet Nieren- und Milzschwellung	+ Ni,Le + Mz,Da ♂
18	70	frisch getötet o.B.	+ Ni + Mz,Le,Da ♂
19	70	frisch getötet Nieren- und Milzschwellung	+ Ni ++ Mz,Le,Da ♂
20	70	frisch getötet o.B.	+ Ni + Mz,Le,Da ♂
Kontrollfische (separat gehalten)			
21	70	frisch getötet o.B.	♂ Ni,Mz,Le, Da ♂
22	70	frisch getötet o.B.	♂ Ni,Mz,Le, Da ♂
23	70	frisch getötet o.B.	♂ Ni,Mz,Le, Da ♂
24	70	frisch getötet o.B.	♂ Ni,Mz,Le, Da ♂
25	70	frisch getötet o.B.	♂ Ni,Mz,Le, Da ♂

- 1 - Bakterienanzucht aus der Niere, durch IFAT bestätigt
 2 - Bakteriennachweis durch IFAT in Organen (Ni - Niere, Mz - Milz, Le - Leber, Da - Darm; ♂ - keine, + - einzelne, ++ - zählbare, +++ - massenhaft Bakterien pro Gesichtsfeld
 3 - o.B. - ohne Besonderheiten

4.3. Fische und Fischseren

4.3.1. Material und Verteilung auf die einzelnen Fischarten

Aus Tabelle 15 geht hervor, daß der Großteil der untersuchten Fischarten den Salmoniden (92,8 % des Gesamtmaterials) zuzurechnen ist, davon mit 77,4 % (Anteil an Salmoniden) die Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) als wichtigste Salmoniden in der Teichwirtschaft. Gefolgt werden sie von den Bachforellen (*Salmo trutta*) mit 13,8 % der Salmoniden und den Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) mit 2,8 %. Die Nicht-Salmoniden sind mit 7,2 % Anteil am Gesamtmaterial vertreten.

Tabelle 15: Verteilung des Untersuchungsmaterials (Fische und Fischseren) auf die einzelnen Fischarten

Fischarten	Anzahl (absolut)	%-Anteil (Salmoniden)	%-Anteil (Gesamtzahl)
Salmoniden	283		92,8
Regenbogenforelle (<i>Salmo gairdneri</i>)	219	77,4	71,8
Bachforelle (<i>Salmo trutta</i>)	39	13,8	12,8
Europäische Seeforelle (<i>Salmo trutta lacustris</i>)	4	1,4	1,3
Silberlachs (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	8	2,8	2,7
Bachsaibling (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	5	1,8	1,6

Fortsetzung Tabelle 15:

Fischspezies	Anzahl (absolut)	%-Anteil (Salmoniden)	%-Anteil (Gesamt)
Seesaibling (<i>Salvelinus alpinus sal-</i> <i>velinus</i>)	3	1,0	1,0
Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)	5	1,8	1,6
Nicht-Salmoniden	22		7,2
Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	7		
Barbe (<i>Barbus barbus</i>)	2		
Hasel (<i>Squalinus leuciscus</i>)	1		
Aitel/Döbel (<i>Squalinus cephalus</i>)	6		
Nase (<i>Chondrostoma nasus</i>)	5		
Barsch (<i>Perca fluviatilis</i>)	1		

Gesamtzahl der untersuchten Fische bzw.-seren: 305

4.3.2. Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Aufgrund der klinischen (pathologisch-anatomisches Bild), bakteriologischen (Anzucht) und fluoreszenzserologischen Untersuchungen wurden die Regenbogenforellen in folgende Gruppen eingeteilt: "BKD-freie" Fische zeigten weder pathologisch-anatomische Besonderheiten noch positive Befunde zum Bakteriennachweis (Anzucht, IFAT) vor. Als "BKD-Carrier" wurden die Fische eingestuft, die pathologisch-anatomisch ohne Besonderheiten, also "gesund", waren, aber mit positivem Bakteriennachweis. Das heißt, daß in der Anzucht und/oder der IFAT "Renibacterium salmoninarum" gefunden werden konnte. Die Gruppe der "BKD-kranken" Fische umfaßt solche mit den BKD-typischen Symptomen. Fische bzw. Fischseren, zu denen keine Angaben über pathologisch-anatomische Veränderungen und dem Nachweis von "Renibacterium salmoninarum" (Anzucht oder IFAT der Organe) vorlagen, wurden ebenfalls zu einer Gruppe "sonstige Regenbogenforellen" zusammengefaßt.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchungen der gesamten Regenbogenforellen auf agglutinierende und hämagglutinationshemmende Antikörper sind in den Tabellen 16 und 17 zu finden. Aus Tabelle 16 ergibt sich, bezogen auf die Regenbogenforellengesamtzahl, ein Anteil von 72,2 % (158 Fische) ohne und 27,8 % (61 Fische) mit positivem Agglutinationstiter. Die Verteilung auf die einzelnen Titerstufen zeigt, daß der höchste Titer 64 betrug; die Titerstufen 8 und 16 weisen mit je 7,7 % der Gesamtzahl der Regenbogenforellen den größten Anteil auf.

Tabelle 16: Agglutinationsergebnisse der Gesamtzahl der Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Agglutinations- titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Regenbogenforellen
0	158	72,2
2	7	3,2
4	10	4,6
8	17	7,7
16	17	7,7
32	5	2,3
64	5	2,3

Gesamtzahl der Regenbogenforellen: 219

mit agglutinierenden Antikörpern: 27,8 % (61 Fische)

ohne agglutinierende Antikörper: 72,2 % (158 Fische)

Aus Tabelle 17 ist zu entnehmen, daß 57,1 % (125 Fische) der Regenbogenforellen keinen HAH-Titer besitzen. 42,9 % der gesamten Regenbogenforellen (94 Fische) haben HAH-Titer; hinsichtlich der Verteilung auf die Titerstufen ist zu ersehen, daß im Hämagglutinationshemmungstest erst Titer ab 4 als positiv gewertet wurden. Der höchste Titer war 64, die meisten positiven Regenbogenforellen (21,9 %, 48 Fische) besaßen eine HAH-Titer von 4.

Tabelle 17: HAH-Ergebnisse der Gesamtzahl der Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

HAH-Titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Regenbogenforellen
0	125	57,1
4	48	21,9
8	27	12,3
16	15	6,8
32	3	1,4
64	1	0,5

Gesamtzahl der Regenbogenforellen: 219

mit HAH-Titer: 42,9 % (94 Fische)

ohne HAH-Titer: 57,1 % (125 Fische)

Ein Vergleich der Agglutinations- und HAH-Resultate (Tabelle 18) zeigt, daß 42,8 % (92 Fische) der Regenbogenforellen weder HAH- noch Agglutinations-Titer besitzen. Die Summe der Fische mit positiver Reaktion (HAH und/oder Agglutination) beträgt 127, also 58,0 % der Gesamtzahl der Regenbogenforellen. Es lagen 15 % mehr HAH-positive als agglutinationspositive Reagenten vor.

Tabelle 18: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der Gesamtzahl der Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Regenbogenforellen
kein HAH- und Agglutinationstiter	92	42,0
HAH- und Agglutinationstiter	28	12,8
nur Agglutinationstiter	33	15,1
nur HAH-Titer	66	30,1
Agglutinationstiter,gesamt	61	27,9
HAH-Titer,gesamt	94	42,9
Gesamtzahl mit Titer	127	58,0

Gesamtzahl der Regenbogenforellen: 219

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen an den Regenbogenforellen getrennt nach den weiter oben genannten Gruppen ("sonstige", "BKD-freie", "BKD-Carrier" und "BKD-kranke" Fische) dargestellt.

Aus Tabelle 19 ist die Verteilung der "sonstigen" Regenbogenforellen auf die Agglutinationstiterstufen zu entnehmen. Der Maximaltiter betrug 64; 75,8 % (106 Fische) der untersuchten Seren dieser Gruppe von insgesamt 140 Fische zeigten keinen Titer, bei 24,2 % (33 Fische) wurden positive Reaktionen festgestellt; es ist eine Anhäufung positiver Seren (mit je 7,7 % Anteil an den gesamten "sonstigen" Regenbogenforellen) bei den Titern 8 und 16 festzustellen.

Tabelle 19: Agglutinationsergebnisse der "sonstigen" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Agglutinations- titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "Sonstigen"
0	106	75,8
2	4	2,9
4	6	4,3
8	10	7,1
16	10	7,1
32	1	0,7
64	3	2,1

Gesamtzahl der "sonstigen" Regenbogenforellen: 140

mit Agglutinationstiter: 24,2 % (34 Fische)

ohne Agglutinationstiter: 75,8 % (106 Fische)

Die folgende Tabelle 20 zeigt, daß 63,0 % (88 Fische) der "sonstigen" Regenbogenforellen keinen HAH-Titer besaßen. 37,0 % (52 Fische) der Seren aus der Gruppe "Sonstige" hatten positive Werte im HAH-Test; der Maximaltiter 64 betrug, die Mehrzahl der positiven Seren (20,7 % der "sonstigen" Regenbogenforellen) war bei Titer 4 zu finden.

Tabelle 20: HAH-Testergebnisse der "sonstigen" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

HAH-Titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "Sonstigen"
0	88	63,0
4	29	20,7
8	10	7,1
16	10	7,1
32	2	1,4
64	1	0,7

Gesamtzahl der "sonstigen" Regenbogenforellen: 140

mit HAH-Titer: 37,0 % (52 Fische)

ohne HAH-Titer: 63,0 % (88 Fische)

Tabelle 21: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der Gruppe der "sonstigen" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an "Sonstigen"
kein HAH- und Agglutinationstiter	71	50,8
HAH- und Agglutinationstiter	17	12,1
nur Agglutinationstiter	17	12,1
nur HAH-Titer	35	25,0
Agglutinationstiter, gesamt	34	24,2
HAH-Titer, gesamt	52	37,1
Gesamtzahl der Titer	69	49,2

Gesamtzahl der "sonstigen" Regenbogenforellen: 140

Ein Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter (Tabelle 21) zeigt, daß bei 50,8 % (71 Fische) der "sonstigen" Regenbogenforellen der Nachweis der Serumantikörper negativ verlief. 49,2 % (69 Fische) dieser Gruppe hatten Antikörper in Agglutination und/oder HAH-Test. Dabei waren 12,9 % mehr HAH- als Agglutinationstiter zu verzeichnen.

Tabelle 22: Agglutinationsergebnisse der "BKD-freien" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Agglutinations- titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD-freien" Regenbogenforellen
0	18	85,7
2	2	9,5
4	0	0,0
8	0	0,0
16	0	0,0
32	1	4,8
64	0	0,0

Gesamtzahl der "BKD-freien" Regenbogenforellen: 21

mit Agglutinationstiter: 14,3 % (3 Fische)

ohne Agglutinationstiter: 85,7 % (18 Fische)

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Serumuntersuchungen der "BKD-freien" Regenbogenforellen mit der Agglutinationsmethode dargestellt. 85,7 % (18 Fische) hatten keine Antikörper, 14,3 % (3 Fische) wiesen Titer auf, wobei der höchste 32 (1 Fisch) war. 2 Fische besaßen einen Titer von 2.

Tabelle 23: HAH-Testergebnisse der "BKD-freien" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

HAH-Titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD-freien" Regenbogenforellen
0	10	47,7
4	5	23,8
8	5	23,4
16	0	0,0
32	1	4,7
64	0	0,0

Gesamtzahl der "BKD-freien" Regenbogenforellen: 21

mit HAH-Titer: 52,3 % (11 Fische)

ohne HAH-Titer: 47,7 % (10 Fische)

Aus Tabelle 23 geht hervor, daß 47,7 % (10 Fische) der "BKD-freien" Regenbogenforellen negativ im HAH-Test reagierten. 52,3 % (11 Fische) der Seren besaßen Antikörper. Der Maximal-titer war 32 (1 (Fisch), die restlichen HAH-Titer finden sich zu gleichen Teilen bei den Titerstufen 4 und 8.

Tabelle 24: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der
"BKD-freien" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an den "BKD-freien"
kein HAH- und Agglutinationstiter	8	38,1
HAH- und Agglutinationstiter	1	4,8
nur Agglutinationstiter	2	9,6
nur HAH-Titer	10	47,6
Agglutinationstiter, gesamt	3	14,3
HAH-Titer, gesamt	11	52,4
Gesamtzahl der Titer	13	67,9

Gesamtzahl der "BKD-freien" Regenbogenforellen: 21

Ein Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter bei "BKD-freien" Regenbogenforellen (Tabelle 24) ergibt um 38,1 % mehr HAH- als Agglutinationstiter. Insgesamt waren 38,1 % (8 Fische) der "BKD-freien" negativ, dagegen konnten bei 67,9 % (13 Fische) Antikörpertiter verzeichnet werden.

Tabelle 25: Agglutinationsergebnisse bei "BKD-Carrier" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Agglutinations- titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD- Carrier"
0	23	63,9
2	1	2,8
4	3	8,3
8	4	11,1
16	3	8,3
32	2	5,6
64	0	0,0

Gesamtzahl der "BKD-Carrier" Regenbogenforellen: 36

mit Agglutinationstiter: 36,1 % (13 Fische)

ohne Agglutinationstiter: 63,9 % (23 ")

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Serumuntersuchungen mit der Agglutinationsmethode bei den "BKD-Carrier" Regenbogenforellen aufgelistet. 63,9 % (23 Fische) von ihnen zeigten negative Resultate, 36,1 % (13 Fische) der "BKD-Carrier" besaßen Agglutinationstiter. Die Verteilung auf die Titerstufen zeigt einen Maximaltiter von 32, der Großteil der positiven Seren hatte Titer von 4-16.

Tabelle 26: HAH-Testergebnisse der "BKD-Carrier" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

HAH-Titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD- Carrier"
0	14	38,9
4	9	25,0
8	10	27,8
16	3	8,3
32	0	0,0
64	0	0,0

Gesamtzahl der "BKD-Carrier" Regenbogenforellen: 36

mit HAH-Titer: 67,1 % (22 Fische)

ohne HAH-Titer: 38,9 % (14 ")

Die HAH-Testergebnisse der "BKD-Carrier" (Tabelle 26) weisen 38,9 % (14 Fische) negative Untersuchungsergebnisse und 67,1 % (22 Fische) Titer auf.

Der Maximaltiter lag bei 16; das Gros der positiven Seren findet sich bei den Titern 4 und 8.

Tabelle 27: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der
"BKD-Carrier" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an "BKD-Carriern"
kein HAH- und Agglutinationstiter	8	22,2
HAH- und Agglutinationstiter	7	19,4
nur Agglutinationstiter	6	16,7
nur HAH-Titer	15	41,7
Agglutinationstiter, gesamt	13	36,1
HAH-Titer, gesamt	22	61,1
Gesamtzahl der Titer	28	77,8

Gesamtzahl der "BKD-Carrier" Regenbogenforellen: 36

Der Vergleich der Serumuntersuchungen mit HAH-Test und Agglutinationsmethode (Tabelle 27) ergibt, daß 22,2 % (8 Fische) der "BKD-Carrier" negativ reagierten, insgesamt 77,8 % (28 Fische) dagegen positiv. Es lagen um 25 % mehr HAH- als Agglutinationstiter vor.

Tabelle 28: Agglutinationsergebnisse der "BKD-kranken" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

Agglutinations- titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD-kranken" Regenbogenforellen
0	11	50,00
2	0	0,00
4	1	4,55
8	3	13,60
16	4	18,20
32	1	4,55
64	2	9,10

Gesamtzahl der "BKD-kranken" Regenbogenforellen: 22

mit Agglutinationstiter: 50,0 % (11 Fische)

ohne Agglutinationstiter: 50,0 % (11 Fische)

Bei den "BKD-kranken" Regenbogenforellen zeigten 50,0 % (11 Fische) keinen Agglutinationstiter und 50,0 % reagierten positiv (Tabelle 28). Der Maximaltiter betrug 64; die Verteilung auf die Titerstufen zeigt eine Mehrzahl der positiven Werte bei der Titerhöhe von 16, gefolgt von 8.

Die Anzahl der negativen Reagenten im HAH-Test liegt mit 59,1 % über derjeniger mit negativem Agglutinationstiter. Bei den 40,9 % positiven "BKD kranken" Reagenten zeigt die Mehrzahl (22,7 %) einen Titer von 4. Der maximale HAH-Titer in dieser Gruppe betrug 16.

Tabelle 29: HAH-Testergebnisse der "BKD-kranken" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

HAH-Titerstufen	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an "BKD-kranken" Regenbogenforellen
0	13	59,1
4	5	22,7
8	2	9,1
16	2	9,1
32	0	0,0
64	0	0,0

Gesamtzahl der "BKD-kranken" Regenbogenforellen: 22

mit HAH-Titer: 40,9 % (9 Fische)

ohne HAH-Titer: 59,1 % (13 ")

Ein Vergleich der Ergebnisse der Serumuntersuchung "BKD-kranker" Regenbogenforellen ergibt 22,7 % negative und 77,3 % positive (gesamt) Reagenten, wobei 9,1 % mehr Agglutinations- als HAH-Titer auftraten (Tabelle 30).

Bei der Untersuchung an Regenbogenforellen ist eine weitgehende Übereinstimmung der Verteilung von Agglutinations- und HAH-Titern bei der Gesamtzahl der untersuchten Regenbogenforellen und der Gruppe "Sonstige" zu erkennen. In der letzteren Gruppe fällt aber die niedrige Zahl an Gesamt-Reagenten auf. Allerdings zeigt sich auch bei den "sonstigen" Regenbogenforellen, daß wie bei der Gesamtzahl dieser Spezies relativ mehr positive HAH- als Agglutinationstiter vorliegen.

Bei den als "BKD-frei" eingestuften Regenbogenforellen besteht eine große Diskrepanz zwischen Negativreagenten in der Agglutinationsmethode und dem HAH-Test auf. Es sind gegenüber 14,3 %

Tabelle 30: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der
"BKD-kranken" Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an "BKD- kranken"
kein HAH- und Agglutinationstiter	5	22,7
HAH- und Agglutinationstiter	3	13,6
nur Agglutinationstiter	8	36,4
nur HAH-Titer	6	27,3
Agglutinationstiter, gesamt	11	50,0
HAH-Titer, gesamt	9	40,9
Gesamtzahl der Titer	17	77,3

Gesamtzahl der "BKD-kranken" Regenbogenforellen: 22

Agglutinationspositiven (gesamt) 38 % mehr HAH-positive Seren festzustellen.

"BKD-Carrier" und "BKD-kranken" Regenbogenforellen erbrachten fast gleiche prozentuale Anteile negativer und positiver Reagenten, jedoch finden sich bei den "BKD-Carriern" 25 % mehr HAH-positive Seren; wogegen die "BKD-Kranken" 9,1 % weniger HAH- als Agglutinationstiter besitzen. Ferner liegen bei "BKD-kranken" Regenbogenforellen die positiven Agglutinationstiter höher als bei den "Carriern".

4.3.3. Bachforellen (*Salmo trutta*)

Die Bachforellen (*Salmo trutta*) waren mit 13,8 % Anteil an den Gesamt-Salmoniden die zweithäufigste Spezies im Untersuchungsmaterial.

In Tabelle 31 sind die Ergebnisse der Serumuntersuchung auf agglutinierende Antikörper der gesamten Bachforellen zusammengefaßt. Dabei zeigte ein Drittel der Fische (13 Seren) keine, zwei Drittel (26 Seren) positive Agglutinationsreaktion. Der Maximaltiter betrug 64, das Gros der positiven Reagenten lag bei einer Titerhöhe von 8-64

Tabellen 31: Agglutinationsergebnisse der Gesamtzahl der Bachforellen (*Salmo trutta*)

Agglutinations- titer	Anzahl der Fische (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Bachforellen
0	13	33,3
2	1	2,6
4	1	2,6
8	6	15,3
16	4	10,3
32	6	15,4
64	8	20,5

Gesamtzahl der Bachforellen: 39

mit Agglutinationstiter: 26 Fische

ohne Agglutinationstiter: 13 "

Im HAH-Test (Tabelle 32) dagegen waren 89,7 % (35 Fische) negativ und 10,3 % (4 Fische) positiv. Der Maximaltiter lag bei 256.

Ein Vergleich der HAH- und der Agglutinationstiter (Tabelle 33) ergibt einen überwiegenden Anteil an den Bachforellen mit positiven Titern (69,2 %, 27 Fische). 30,8 % der gesamten Bachforellenserien reagierten negativ. HAH-Titer traten immer nur in Kombination mit Agglutinationstitern auf.

Tabelle 32: HAH-Testergebnisse der gesamten Bachforellen (*Salmo trutta*)

HAH-Titerstufen	Anzahl (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Bachforellen
0	34	87,20
4	1	2,56
8	0	0,00
16	1	2,56
32	1	2,56
64	1	2,56
128	0	0,00
256	1	2,56

Gesamtzahl der Bachforellen: 39

mit HAH-Titer: 12,8 % (5 Fische)

ohne HAH-Titer: 87,2 % (34 ")

Tabelle 33: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter bei den Gesamt-Bachforellen (*Salmo trutta*)

	Anzahl (absolut)	%-Anteil an Gesamt- Bachforellen
kein HAH- und Agglutinationstiter	12	30,8
HAH- und Agglutinationstiter	5	12,8
nur Agglutinationstiter	22	56,4
nur HAH-Titer	0	0,0
Gesamtzahl der Titer	27	69,2

Gesamtzahl der Bachforellen: 39

Analog zu den Regenbogenforellen wurden auch die Bachforellen in die Gruppen "Sonstige", "BKD-frei", "BKD-Carrier" und "BKD-krank" eingeteilt.

Dabei konnte bei Fischen der Kategorie "sonstige" in einem von 5 Seren ein Agglutinationstiter von 64 und ein HAH-Titer von 64 festgestellt werden. "BKD-frei" eingestufte Bachforellen wiesen in 12 von 15 Fällen Agglutinationstiter auf, die sich von 8 bis 64 erstreckten. Ihre Verteilung ist aus Tabelle 34 ersichtlich.

Dagegen besaßen nur 3 von 15 "BKD-freien" Bachforellen HAH-Antikörper mit Titerhöhen von 16 bis 256 (Verteilung siehe Tabelle 35). Ein Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter (Tabelle 36) ergibt 3 Fische ohne und 12 Fische mit Titern, wobei HAH-Titer nur mit Agglutinationstitern zusammen auftraten.

Tabelle 34: Agglutinationsergebnisse der "BKD-freien" Bachforellen (*Salmo trutta*)

Agglutinationstiterstufen	Anzahl (absolut)
0	3
2	0
4	0
8	2
16	2
32	3
64	5

Gesamtzahl der "BKD-freien" Bachforellen: 15

mit Agglutinationstiter : 2 Fische

ohne " 12 "

Tabelle 35: HAH-Testergebnisse bei "BKD-freien" Bachforellen (*Salmo trutta*)

HAH-Titerstufen	Anzahl (absolut)
0	12
4	0
8	0
16	1
32	1
64	0
128	0
256	1

Gesamtzahl der "BKD-freien" Bachforellen: 15

mit HAH-Titer: 3 Fische

ohne HAH-Titer: 12 Fische

Tabelle 36: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der
"BKD-freien" Bachforellen (*Salmo trutta*)

	Anzahl (absolut)
kein HAH- und Agglutinationstiter	3
HAH- und Agglutinationstiter	3
nur Agglutinationstiter	9
nur HAH-Titer	0
Gesamtzahl der Titer	12

Gesamtzahl der "BKD-freien" Bachforellen: 15

Von den 7 "BKD-Carrier" Bachforellen besaßen 6 Agglutinations-
titer, die wie Tabelle 37 zu entnehmen ist, von 8 bis 64
verteilt sind.

Tabelle 37: Agglutinationsergebnisse der "BKD-Carrier" Bachfo-
rellen (*Salmo trutta*)

Agglutinationstiterstufen	Anzahl (absolut)
0	1
2	0
4	0
8	1
16	1
32	2
64	2

Gesamtzahl der "BKD-Carrier" Bachforellen: 7

mit Agglutinationstiter: 6 Fische

ohne Agglutinationstiter: 1 Fisch

Bei den "BKD-kranken" Bachforellen besaßen 5 von 12 Fischen keine agglutinierenden Antikörper. Die 7 positiven Reagenten wiesen Titer von 2 bis 32 (siehe Tabelle 38) auf. Eines der 12 Seren hatte einen HAH-Titer von 4.

Tabelle 38: Agglutinationstiter bei "BKD-kranken" Bachforellen (*Salmo trutta*)

Agglutinationstiterstufen	Anzahl (absolut)
0	5
2	1
4	1
8	3
16	1
32	1
64	0

Gesamtzahl der "BKD-kranken" Bachforellen: 12	
mit Agglutinationstiter:	7 Fische
ohne " :	5 "

Zusammenfassend ergeben sich für die Gesamtzahl der Bachforellen (*Salmo trutta*) Agglutinationstiter, die vor allem in den höheren Bereichen von 8 bis 64 liegen, mit dem größten Anteil beim Maximaltiter 64. Dagegen sind nur 12,8 %, also 5 von 39 Fischen, mit positiver Reaktion zu verzeichnen, die sich auf alle Titerstufen gleich verteilen. Ferner kommen HAH-Titer nur in Kombination mit Agglutinationstitern vor. Obwohl 15 Bachforellen als "BKD-frei" eingestuft wurden, besaß ihre überwiegende Mehrheit (12 von 15 Fischen) positive Agglutinationsergebnisse, die sich wie bei den "Gesamt-Bachforellen" auf die höhe-

ren Titerstufen 8 bis 64 verteilen, mit der größten Zahl positiver Reagenten bei Titer 64. Nur 3 "BKD-freie" Bachforellen hatten zusätzlich hohe HAH-Titer von 16, 32 und 256.

"BKD-Carrier" zeigten ebenfalls vorwiegend hohe Agglutinationstiter (8 bis 64), ohne jedoch positive HAH-Ergebnisse zu besitzen. Dagegen hatten "BKD-krankte" Bachforellen, bezogen auf deren Gesamtzahl, weniger Agglutinationstiter, die sich bis maximal 32 verteilten, mit der größten Anhäufung bei Titer 8.

4.3.4. Restliche Salmoniden

Die untersuchten Silberlachse (*Oncorhynchus kisutch*) zeigten in der Agglutinationsmethode 7 negative und 1 positiven (Titer 32) Reagenten. Im HAH-Test erwiesen sich 5 Silberlachsseren als negativ, 3 besaßen je einen HAH-Titer von 8. Tabelle 39 ist zu entnehmen, daß 5 von 8 Silberlachsen negativ und 3 positiv reagierten, wobei mehr HAH- als Agglutinationstiter zu verzeichnen waren.

Tabelle 39: Vergleich der HAH- und der Agglutinationsergebnisse bei Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*)

Anzahl der Fische	

kein Titer	7
HAH- und Agglutinationstiter	1
nur Agglutinationstiter	1
nur HAH-Titer	2
Gesamtzahl der Titer	4

Gesamtzahl der Silberlachse: 8

Einer der Lachse war klinisch an BKD erkrankt, besaß aber keine meßbaren Antikörper. Von 3 "BKD-freien" reagierte ein Fisch sowohl in der Agglutinationsmethode (Titer 16) als auch im HAH-Test (Titer 8) positiv. Von den 4 "BKD-Carrier" Silberlachsseren waren drei negativ und eines besaß einen HAH-Titer von 8.

Von den 5 untersuchten Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) konnte bei einem "Renibacterium salmoninarum" aus der Niere isoliert werden. Bei allen untersuchten Fischen wurde das Bakterium in den Organen (Niere, Milz, Leber, Darm) durch IFAT nachgewiesen; alle Bachsaiblinge waren pathologisch-anatomisch

ohne Besonderheiten, also "BKD-Carrier", in deren Seren Agglutinationstiter (einmal Titer 2, dreimal Titer 4, einmal Titer 8), aber keine HAH-Reaktion zu finden waren (Tabelle 40).

Von den 4 Seeforellen (*Salmo trutta lacustris*) lagen zu einer keine Angaben über pathologisch-anatomische Veränderungen und Bakteriennachweis vor, die Serumuntersuchung verlief negativ. Die restlichen drei Seeforellen waren fluoreszenzserologisch (Organe: Niere, Milz, Leber, Darm) positiv, aus den Nieren konnte der Erreger nicht isoliert werden. Der HAH-Test verlief bei allen negativ, die "BKD-Carrier" wiesen in zwei Fällen ein Agglutinationstiter von 4, in einem Fall einen Titer von 8 auf.

Zu den drei Seesaiblingen (*Salvelinus alpinus fontinalis*) lagen keine Angaben zum pathologisch-anatomischen Bild und zum Bakteriennachweis vor. In einem dieser Seren lag ein Agglutinationstiter von 8 vor.

In einer der fünf Äschen (*Thymallus thymallus*) wurde "Renibacterium salmoninarum" fluoreszenzserologisch in der Milz nachgewiesen. Zu den anderen lagen keine weiteren Angaben vor. Wie Tabelle 41 zeigt, ergaben sich in den Äschenserren ein Agglutinations- und drei HAH-Titer.

Tabelle 40: Vergleich der HAH- und Agglutinationsergebnisse der Bachsaiblinge (*Salvelinus fontinalis*)

	Anzahl der Fische	Titer
kein HAH- und Agglutinationstiter	0	
Agglutinations- und HAH-Titer	0	
nur Agglutinationstiter	1	2
	3	4
" "	1	8
nur HAH-Titer	0	
Gesamtzahl der Titer	5	

Gesamtzahl der Bachsaiblinge: 5

Tabelle 41: HAH- und Agglutinationsergebnisse der Äschen (*Thymallus thymallus*)

	Anzahl der Fische	Titer
kein HAH- und Agglutinationstiter	1	
HAH- und Agglutinationstiter	0	
nur Agglutinationstiter	1	8
nur HAH-Titer	2	4
" "	1	8
Gesamtzahl der Titer	4	

Gesamtzahl der Äschen: 5

4.3.5. Nicht-Salmoniden

An sieben Karpfen (*Cyprinus carpio*) verliefen alle Untersuchungen auf BKD (pathologisch-anatomisch, Bakterienanazucht, IFAT der Organe) negativ, auch die Serumuntersuchungen auf HAH- und Agglutinationstiter waren negativ.

Die zwei Barben (*Barbus barbus*) wurden ebenfalls als "BKD-frei" eingestuft, wiesen beide einen Agglutinationstiter von 32, aber keine HAH-Titer auf.

Zu dem einzigen Vertreter der Spezies Hasel (*Squalinus leuciscus*) lagen keine Angaben zum pathologisch-anatomischen Bild vor, der Bakteriennachweis war negativ. Die Serumuntersuchung erbrachte einen Agglutinationstiter von 64 und einen HAH-Titer von 4.

Alle sechs Aitel (*Squalinus cephalus*) waren pathologisch-anatomisch ohne Besonderheiten, der Bakteriennachweis verlief negativ. Mit der Agglutinationsmethode wurden in vier Seren Titer festgestellt: 2 Fische mit Titer 32, einer mit Titer 64, einer mit Titer 128. Der HAH-Test erbrachte bei fünf von sechs Aiteln positive Reaktionen: ein Fisch mit Titer 4, einer mit Titer 8, einer mit Titer 16 und zwei mit Titer 64. In Tabelle 42 ist ein Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter bei den gesamten Aiteln zu finden, aus der zu ersehen ist, daß alle Fische dieser Spezies Antikörpertiter besaßen, wobei mehr positive HAH- als Agglutinationsreaktionen vorlagen.

Tabelle 42: Vergleich der HAH- und Agglutinationstiter der Aitel (*Squalinus cephalus*)

kein HAH- und Agglutinationstiter	0	Fische
HAH- und Agglutinationstiter	3	"
nur Agglutinationstiter	1	"
nur HAH-Titer	2	"
Gesamtzahl der Titer	6	"

Gesamtzahl der Aitel: 6

Die Vertreter der Spezies Nase (*Chondrostoma nasus*) waren pathologisch-anatomisch alle ohne Besonderheiten; der Bakteriennachweis verlief negativ. In einem Serum wurde ein Agglutinationstiter von 8 und ein HAH-Titer von 128 gefunden, in dreien lagen nur HAH-Titer von 128 vor. Insgesamt lagen bei drei von fünf Fischen positive Titer vor.

In einem Exemplar der Spezies Barsch (*Perca fluviatilis*) wurde in Niere, Leber und Milz "*Renibacterium salmoninarum*" fluoreszenzserologisch nachgewiesen, der Fisch war pathologisch-anatomisch ohne Besonderheiten; das Bakterium konnte nicht isoliert werden. Im Serum des Barsches wurde sowohl ein Agglutinations-, als auch ein HAH-Titer von 8 ermittelt.

4.3.6. Untersuchung der Fischseren mit der Doppelimmuno- diffusion (DID) nach Ouchterlony

Die Seren aller Versuchsfische und repräsentativer Stichproben des Untersuchungsmaterials wurden mit der Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony (Mikromethode siehe III.2.6. und III.4.1.2.) untersucht.

Auch bei Fischseren mit hohen Agglutinations- und/bzw. HAH-Titern konnten keine präzipitierenden Antikörper gegen "Renibacterium salmoninarum" nachgewiesen werden.

IV. Diskussion

Bei den in der Literatur zum Nachweis der BKD genannten Labormethoden ist grundsätzlich zwischen denen mit Bakterien-nachweis (Übersicht KLONTZ, 1982) und denen mit Antikörper-nachweis im Blutserum zu unterscheiden.

Was den Bakteriennachweis betrifft, so kann die in der Literatur beschriebene höhere Empfindlichkeit der Indirekten Immunofluoreszenz (IFAT) gegenüber der Anzucht (BULLOCK und STUCKEY, 1975; EVELYN et al., 1978; PATERSON et al., 1979; LAIDLER, 1980; LALLIER et al., 1981; PFEIL-PUTZIEN et al., 1985 a,b) durch die vorliegenden Befunde bestätigt werden.

Aus eigenen Erfahrungen ist noch hinzuzufügen, daß in Beständen, die mit Antibiotika behandelt wurden, der ohnehin sehr zeitraubende Nachweis über die Erregeranzucht - laut EVELYN et al. (1973) i.d.R. 3-10 Tage, aber auch 3-4 Wochen beanspruchend - trotz augenfälliger Krankheitssymptome und massenhaftem Bakterienauftreten in immunfluoreszenzgefärbten Organproben negativ verlief. Dagegen wiesen AUSTIN et al. (1985) darauf hin, daß sich unspezifische Kreuzreaktionen mit anderen coryneformen Bakterien ergeben könnten, und deshalb die BKD-Diagnostik nicht allein auf der Immunofluoreszenz basieren sollte. Dies konnte in eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Bevor auf die getesteten Antikörperrnachweismethoden eingegangen wird, sei noch erwähnt, daß im Infektionsversuch an Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) übereinstimmend mit den Angaben von IWAMA und GREER (1980) eine horizontale Übertragung des Bakteriums beobachtet wurde. So konnte bei allen nicht infizierten Kontrollfischen, die mit den infizierten zusammen im Aquarium gehalten wurden (Tabelle 14) eine stattgefundene Infektion sowohl durch Anzucht des Erregers, als auch durch IFAT in den Organen Niere und Leber festgestellt werden. Eine vertikale Übertragung des Erregers (EVELYN et al., 1984) konnte aufgrund von Feldbeobachtungen nur vermutet werden.

Bisher wurde über serologische Nachweismethoden von Antikörpern gegen "*Renibacterium salmoninarum*" noch wenig gearbeitet. Die einzige erprobte Methode ist die Agglutination (EVELYN et al., 1971; BAUDIN-LAURENCIN et al., 1977; WEBER und ZWICKER, 1979; Paterson et al., 1981 a,b).

In dieser Arbeit wurde neben einer Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony (OUCHTERLONY, 1958 und 1964) zum BKD-Antikörpernachweis im Fischserum erstmals der in der Virologie gebräuchliche Hämagglutinationshemmungstest - HAH (HIRST, 1941; MCCLELLAND und HARE, 1941) eingesetzt.

Die serologischen Methoden haben den entscheidenden Vorteil, daß nur eine Blutprobe und nicht der ganze Fisch zur Untersuchung nötig ist. Dies gilt besonders für die Beurteilung des Infektionsgeschehens in wertvollen Laichfischbeständen. Zudem können größere Probenzahlen mit bei weitem geringerem Aufwand untersucht werden.

Eine vergleichende Wertung der in dieser Arbeit gemessenen Titer agglutinierender Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" mit Resultaten anderer Autoren ist nur bedingt möglich, da in der Literatur nur Angaben für den Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) (WEBER und ZWICKER, 1979; PATERSON et al., 1981 b), den Sockeye-Lachs (*Oncorhynchus nerka*) (EVELYN et al., 1971) und den Silberlachs (*Oncorhynchus kisutch*) (BAUDIN-LAURENCIN et al., 1977) vorliegen. Ferner wurden die Antikörpertiter außer in einer Felduntersuchung beim Atlantischen Lachs (*Salmo salar*) (WEBER und ZWICKER, 1979) nur nach Immunisierung der Fische mit inaktivierter, adjuvansversetzter "*Renibacterium salmoninarum*"-Suspension bestimmt.

Die Maximaltiter agglutinierender Antikörper in der vorliegenden Arbeit betrugen bei Regenbogenforellen 32-64, wogegen im Verlauf von Immunisierungsversuchen mit i.p. Injektion am Atlantischen Lachs von PATERSON et al. (1981 b) Titer von 20-20480 und bei Sockeye-Lachsen nach i.p. erfolgter Vakzinierung mit "*Renibacterium salmoninarum*" Titer von 10-5120 (EVELYN et al., 1971) abhängig von der Injektionsdosis gemessen wurden.

30 Tage nach der Immunisierung von Sockeye-Lachsen konnten EVELYN et al. (1971) bei einem von 10 Fischen einen Agglutinationstiter von 10 feststellen, nach 60 Tagen kamen Titer von 80-1280 vor. Dagegen konnte in dieser Arbeit bei Silberlachssetzlingen (*O. kisutch*) im Infektionsversuch nach 30 bzw. 33 Tagen bereits ein Agglutinationstiter von 64 gemessen werden; bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) wurden 42 Tage post infectionem Titer von 32-64 gefunden. Laut EVELYN et al. (1971) liegt außerdem eine Dosierungsabhängigkeit der Antikörpertiter vor. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BAUDIN-LAURENCIN et al. (1977) bei Silberlachsen mit Titermittelwerten von 115-320. Bei allen Immunisierungsversuchen wurde die Titerhöhenentwicklung jedoch chronologisch längerfristig (bis zu einem Jahr) verfolgt, was in dieser Arbeit nicht getestet wurde.

Zudem handelte es sich bei den hier untersuchten Seren nicht um künstlich infizierte bzw. immunisierte Fische, sondern um natürlich infizierte Tiere aus dem Feld.

Ein Vergleich der Titerhöhen gegen "*Renibacterium salmoninarum*" ist deshalb noch am ehesten mit denen von WEBER und ZWICKER (1979) von Wildfängen Atlantischer Lachse (*Salmo salar*) aus 3 kanadischen Flüssen möglich. Dort wurden in einem Fluß, in dem BKD seit langem (PIPPY, 1969) endemisch vorkommt, meist Titer von 40-320 (maximal 640) gefunden. In den anderen zwei Flüssen, die nicht als BKD-endemisch eingestuft worden waren, konnten vor allem Titer von unter 10 bis maximal 80 gemessen werden, was der Lage in der Bundesrepublik Deutschland nahekommt, denn hier ist die Krankheit auch erst seit 1984 beschrieben (HOFFMANN et al., 1984).

Ferner wurde in der Literatur der Aussagewert der jeweils niedrigsten Titer als fraglich betrachtet. So stufen EVELYN et al. (1971) sowie WEBER und ZWICKER (1979) in ihren Immunisierungsversuchen Titer kleiner 10 als negativ ein; dies allerdings bei einer Bandbreite von 10-10240. Laut EVELYN (Nanaimo, Kanada, persönliche Mitteilung, 1985) kommen bei Pazifiklachsen

(*Oncorhynchus* spp.) auch in BKD-freien Beständen Agglutinititer bis zu 4 vor.

Dabei sind auch Laborunterschiede zu berücksichtigen. An eigenen Regenbogenforellen aus SPF-Haltung konnten solche Beobachtungen nicht gemacht werden. Dennoch ist bei den als "BKD-frei" eingestuften Regenbogenforellen in 2 Fällen ein Titer von 2 aufgetreten. Deshalb wird diese Titerhöhe zumindest als fraglich bewertet. Insgesamt trat Titer 2 bei 305 Fischseren siebenmal auf.

Die untersuchten Regenbogenforellen zeigten in der Mehrzahl positiven Reagenten bei Titer 8-16 und einige Reagenten mit Titern bis 64. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der ebenfalls zufallsbestimmten Auswahl an "Sonstigen", d.h. Fischen ohne Angaben zum pathologisch-anatomischen Bild bzw. Bakteriennachweis.

Im Unterschied dazu zeigten die "BKD-kranken" Regenbogenforellen einen höheren Anteil positiver Reagenten im Agglutinationstest und zudem auch einen höheren Durchschnittstiter als "BKD-Carrier", bei denen die Auseinandersetzung mit dem Antigen vermutlich schon längere Zeit zurückliegen und somit bereits Titerabfälle eingetreten sind. Zu dieser Vermutung geben auch Literaturangaben Anlaß, die nach der einmaligen Antigenapplikation im Immunisierungsversuch mit "*Renibacterium salmoninarum*" zunächst ansteigende Titermittelwerte bis zu einem durchschnittlichen Maximum nach einem halben Jahr mit anschließendem Titerabfall aufweisen (BAUDIN-LAURENCIN et al., 1977; PATERSON et al., 1981 a,b).

Um eine weitere Methode zur Bestimmung von BKD-Antikörpern im Fischserum zur Verfügung zu haben, die präzise, einfach und ausreichend empfindlich ist, wurde der Hämagglutinationshemmungstest (HAH) eingeführt. Dieser Test erbrachte bei der Gesamtzahl der Regenbogenforellen, im Vergleich zur Agglutinationsmethode, 15 % mehr Positiv-Reagenten.

Eine Gegenüberstellung der beiden Methoden (Tabelle 18) zeigt, daß die HAH-Antikörper auch unabhängig von agglutinierenden Antikörpern auftraten. Dies spricht dafür, daß, wie ELLIS (1982) annimmt, verschiedene Subklassen der Fischantikörper existieren. ELLIS (1982) führt hierbei komplementbindende, agglutinierende und präzipitierende Antikörper an.

Bei "BKD-freien" Regenbogenforellen konnten mit der HAH-Methode in einer wesentlich größeren Zahl von Fischen (52,3 %) Antikörper gegen BKD nachgewiesen werden als mit der Agglutination (14,3 %), was auf eine weite zurückliegende Auseinandersetzung mit dem Bakterium oder unspezifische Reaktionen hindeutet.

Letzteres kann aber ausgeschlossen werden, da Regenbogenforellen aus SPF-Haltung niemals Antikörper gegen "Renibacterium salmoninarum" in Agglutination und HAH-Test aufwiesen. Aus den "BKD-freien" Regenbogenforellen wurden auch keine anderen grampositiven Bakterien isoliert, die eine Immunantwort und somit Kreuzreaktionen hervorrufen könnten.

Ferner ergibt ein Vergleich der HAH-Titerverteilung der "BKD-Carrier" Regenbogenforellen mit den "BKD-kranken", daß erstere mit 67,2 % erheblich mehr positive Reagenten als zweite (40,9 %) besitzen. Das heißt, daß HAH-Titer anscheinend erst im späteren Verlauf der Immunreaktion auftreten. Um diese Vermutung zu belegen, müßte anhand einer natürlichen oder künstlichen Infektion mit "Renibacterium salmoninarum" die Antikörperentwicklung mit Titerhöhen bestimmt werden.

Die untersuchten Bachforellen (*Salmo trutta*) wiesen, verglichen mit den Regenbogenforellen, höhere Durchschnittstitern und relativ mehr positive Reagenten in der Agglutination auf. Dies spiegelt eine stärkere Auseinandersetzung mit dem Antigen wider, was auch darin begründet sein könnte, daß Bachforellen laut BULLOCK et al. (1971), MITCHUM und SHERMAN (1979) sowie SCHÄPERCLAUS (1979) für die Krankheit empfindlicher sind als Regenbogenforellen und Silberlachse.

Aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Fische ist ein Vergleich der Agglutinationsergebnisse der Gruppen "BKD-frei", "BKD-Carrier" und "BKD-krank" nicht aussagekräftig. Es zeigt sich aber bei "BKD-freien" Bachforellen, daß eine Auseinandersetzung mit dem Erreger stattgefunden haben muß, da Agglutinationstiter bis 64 festgestellt wurden. Im HAH-Test wiesen die Bachforellen 87,2 % negative Seren auf, die 33,3 % negativen in der Agglutination gegenüberstehen. Ein Vergleich der Agglutinations- und der HAH-Titer (Tabellen 33 und 36) läßt den Schluß zu, daß die HAH-Methode bei den Bachforellen schlechter geeignet ist, um Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" nachzuweisen. Das konnte bei noch laufenden Felduntersuchungen an Bachforellen (MÜLLER, F., Aulendorf, persönliche Mitteilung, 1985) bestätigt werden.

Die geringe Anzahl untersuchter Seren der restlichen Salmonidenspezies läßt nur begrenzt Schlüsse zu, die noch an größerem Probenmaterial zu überprüfen sind. So erscheint die HAH-Methode bei Silberlachsen (*O. kisutch*) und Äschen (*Thymallus thymallus*) ein empfindlicherer Antikörperrnachweis zu sein als die Agglutination.

Bei Seeforellen (*Salmo trutta lacustris*), Bachsaiblingen (*Salvelinus fontinalis*) und Seesaiblingen (*Salvelinus alpinus*) wurden keine HAH-Titer festgestellt, jedoch zeigen positive Agglutinationsergebnisse eine Immunantwort an.

Bei Nicht-Salmoniden ist die BKD nicht bekannt, dennoch konnten Antikörpertiter gegen "*Renibacterium salmoninarum*" in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden.

Die Karpfen (*Cyprinus carpio*) aus eigener SPF-Haltung waren bakteriologisch (Anzucht, IFAT) sowie serologisch (HAH, Agglutination) BKD-frei. Dagegen kamen die anderen serologisch positiven (in Agglutinations- und HAH-Test) Nicht-Salmoniden Barbe (*Barbus barbus*), Hasel (*Squalinus leuciscus*), Aitel (*Squalinus*

cephalus), Nase (*Chondrostoma nasus*) und Barsch (*Perca fluviatilis*) aus Freigewässern, in denen die BKD bei Salmoniden endemisch auftrat. Das deutet darauf hin, daß diese Nicht-Salmoniden sich mit "*Renibacterium salmoninarum*" auseinandergesetzt haben müssen. Der Barsch war fluoreszenzserologisch in Niere, Leber und Milz positiv, das Bakterium konnte aber nicht aus den Organen isoliert werden. Zudem wies sein Serum sowohl agglutinierende als auch HAH-Antikörper auf. Bei dieser Fischart, die sich räuberisch von anderen Fischen ernährt, liegt eine perorale Aufnahme des Erregers nahe.

Aus den untersuchten Nicht-Salmoniden konnten keine coryneformen Bakterien, die zu Kreuzreaktionen führen könnten isoliert werden, was mit den Ergebnissen von FUHRMANN (1983) übereinstimmt.

Daß es sich im HAH-Test um die Messung spezifischer Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" handelt, wird durch folgende Überlegungen erhärtet: Die SPF-Regenbogenforellen besaßen vor der Infektion keine Antikörper gegen den BKD-Erreger (Agglutination, HAH), im Verlauf des Versuchs jedoch wurde Antikörperbildung gegen "*Renibacterium salmoninarum*" gemessen. Dagegen waren die nicht infizierten, separat gehälterten Kontrollfische auch nach Versuchsende serologisch BKD-negativ.

Außerdem wurden in umfangreichem Probenmaterial (Müller, F., Aulendorf, persönliche Mitteilung, 1985) aus Fischzuchten ohne BKD-Vorgeschichte ebenfalls keine HAH-Antikörper nachgewiesen.

Im Gegensatz zu Literaturangaben (ELLIS, 1982; POLLI, 1982; DÖLLER und ENZMANN, 1982) konnten in den vorliegenden Untersuchungen weder bei Fischen aus den Infektionsversuchen noch aus dem Untersuchungsmaterial präzipitierende Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" gefunden werden. Methodische Fehler bei der Antigenaufbereitung sind auszuschließen, da bei allen Kaninchen-Anti-KD-Seren einwandfreie Präzipitationslinien gegen alle BKD-Stämme auftraten; zudem wurden die gleichen

Versuchsbedingungen wie von POLLI (1982) verwendet, der mit seiner Methode präzipitierende Antikörper gegen *Saprolegnia parasitica* in Fischseren feststellte. Das heißt, daß gegen "*Renibacterium salmoninarum*" entweder keine präzipitierenden Antikörper gebildet wurden, oder Titer bestanden, die weit unter der Nachweisgrenze der verwendeten DID-Methode lagen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der HAH-Test gegenüber der Agglutination übereinstimmend mit vorläufigen Ergebnissen aus Feldversuchen (MÜLLER, F., Aulendorf, persönliche Mitteilung, 1985) bei Regenbogenforellen eine empfindlichere, spezifische und technisch besser auswertbare Methode zur Erfassung des Krankheitsgeschehens bei Bakterieller Nierenerkrankung (BKD) der Salmoniden ist. Insbesondere die HAH-Ergebnisse weisen auf eine weite Verbreitung des BKD-Eregers "*Renibacterium salmoninarum*" in der Bundesrepublik Deutschland hin.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verbreitung der Bakteriellen Nierenerkrankung (BKD) bei Salmonidenspezies in der Bundesrepublik Deutschland untersucht.

Dazu wurde der Erreger "*Renibacterium salmoninarum*" aus Organmaterial der Fische durch Anzucht und Immunofluoreszenz (IFAT) nachgewiesen. Zum Antikörpernachweis im Blutserum wurden die Agglutinationsmethode, der Hämagglutinationshemmungstest (HAH) und die Doppelimmunodiffusion (DID) nach Ouchterlony getestet. Um positives Vergleichsmaterial zu erhalten, wurden Infektionsversuche an Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) und Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) durchgeführt. Ferner wurde ein gegen "*Renibacterium salmoninarum*" (Stamm ATCC 33209) gerichtetes Antiserum im Kaninchen hergestellt.

Folgende Resultate wurden erzielt:

- 1) Die Kaninchen-Anti-KD-Serien besaßen gegen alle getesteten "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme spezifische Antikörper, die zur Anwendung in der Immunofluoreszenz (IFAT) geeignet waren.
- 2) Alle Kaninchen-Anti-KD-Seren wiesen spezifische agglutinierende, präzipitierende (Immunodiffusion) und hämagglutinationshemmende Antikörper auf.
- 3) Die Pathogenität der verwendeten "*Renibacterium salmoninarum*"-Stämme für Salmoniden (Regenbogenforellen und Silberlaxse) zeigte sich im Infektionsversuch.
- 4) Im Versuch konnte die horizontale Übertragung des Bakteriums bestätigt werden.
- 5) Die serologischen Methoden waren den verwendeten Bakterienachweismethoden überlegen, wobei der HAH-Test sich bei Regenbogenforellen (mit Einschränkung bei klinisch kranken Fischen) empfindlicher zeigte als die Agglutination, um

Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" zu finden.

- 6) Bei Bachforellen (*Salmo trutta*) stellte sich die Agglutinationsmethode als geeigneter heraus, um das Infektionsgeschehen bei BKD zu beurteilen. Bei dieser Spezies wurde eine stärkere Antikörperbildung gegen den BKD-Erreger beobachtet als bei den Regenbogenforellen.
- 7) Die Untersuchungen an den restlichen Salmonidenspezies lassen den HAH-Test bei Silberlachsen (*Oncorhynchus kisutch*) und Äschen (*Thymallus thymallus*) als der Agglutination überlegen erscheinen.
Bei Seeforellen (*Salmo trutta lacustris*), Bachforellen (*Salvelinus fontinalis*) und Seesaibling (*Salvelinus alpinus fontinalis*) konnte zwar eine Immunreaktion beobachtet werden, aber aufgrund der geringen Probenzahl war kein Vergleich der Antikörpernachweismethoden möglich.
- 8) Unter den aus BKD-endemischen Gewässern stammenden Nichtsalmoniden Barbe (*Barbus barbus*), Hasel (*Squalinus leuciscus*), Aitel (*Squalinus cephalus*), Nase (*Chondrostoma nasus*) und Barsch (*Perca fluviatilis*) wurden serologisch positive Reagenten festgestellt, was eine Auseinandersetzung mit dem BKD-Erreger "*Renibacterium salmoninarum*" widerspiegelt.
- 9) Der Nachweis präzipitierender Antikörper gegen "*Renibacterium salmoninarum*" in Fischseren verlief negativ.

VI. Summary: Studies on the serological Diagnosis of Bacterial Kidney Disease (BKD) of Salmonids

The present paper describes studies on the distribution of bacterial kidney disease (BKD) in salmonid species in the Federal Republic of Germany. The agent of the disease "Renibacterium salmoninarum" was isolated from organs or detected in tissue smears stained by indirect fluorescent antibody technique (IFAT). Serum agglutination, hemagglutination-inhibition-test (HAH) and double immunodiffusion (DID) according to Ouchterlony were used to find antibodies in blood serum. Infection trials on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) were performed to get positive control data (tissue samples and blood serum). Furthermore an antiserum against "Renibacterium salmoninarum" (ATCC-strain 33209) was produced in rabbits.

The following results were obtained:

- 1) The rabbit-anti-KD-sera carried specific antibodies - suitable for indirect fluorescent antibody technique (IFAT) - against all used "Renibacterium salmoninarum"-strains.
- 2) All rabbit-anti-KD-sera possessed specific agglutinating, precipitating (immunodiffusion), and hemagglutination-inhibiting antibodies.
- 3) The pathogenicity of "Renibacterium salmoninarum"-strains on salmonids (rainbow trout, coho salmon) was proved by infection trials.
- 4) The horizontal transmission of the bacterium could be observed in the infection trials.
- 5) Serological methods were superior to bacterium-detection-tests. In order to find antibodies against "Renibacterium salmoninarum" in rainbow trout (except those trout showing

clinical signs of BKD) the hemagglutination-inhibition-test proved to be more sensitive than the agglutination method.

- 6) In brook trout (*Salmo trutta*) the agglutination test was more suitable to evaluate the infection status of BKD. This species of fish developed a more intense antibody production against the agent of BKD than the rainbow trout.
- 7) As far as the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the grayling (*Thymallus thymallus*) were concerned the hemagglutination-inhibition-test seemed to be more suitable than the agglutination method.
An immune reaction could be observed in lake trout (*Salmo trutta lacustris*), brook trout (*Salvelinus fontinalis*), and arctic charr (*Salvelinus alpinus fontinalis*), but due to the low number of samples a comparison of the serological methods was not possible.
- 8) Some positive serological responds were found in non-salmonid fishes as barbel (*Barbus barbus*), dace (*Squalinus leuciscus*), chub (*Squalinus cephalus*), nose-carp (*Condrostoma nasus*), and perch (*Perca fluviatilis*) from waters, where BKD was endemic. This result proves that an immune reaction against the agent of BKD "*Renibacterium salmoninarum*" must have taken place.
- 9) Precipitating antibodies against "*Renibacterium salmoninarum*" could not be detected in blood serum of fish.

VII. Literaturverzeichnis

Acton, R.F.T., Weinheimer, P.F., Hildemann, W.H. and E.E. Evans
(1969):

Induced bactericidal response in the hagfish.
J. Bact. 99, 626 - 628

Acton, R.T., Weinheimer, P.F., Hildeman W.H. and E.E. Evans
(1971):

Bactericidal antibody response in the pacific hagfish,
Eptatretus stoutii.
Infection Immunity 4, 160 - 166

Agius, C. (1979):

The role of melano-macrophage centres in iron storage
in normal and diseased fish.
J. Fish Dis. 2, 337 - 343

Agius, C. (1980):

Phylogenetic development of melano-macrophage centres
in fish.
J. Zool. 191, 11 - 32

Ahne, W. (1980):

Viruserkrankungen der Fische.
In: Reichenbach-Klinke, H.H., Krankheiten und Schä-
dungen der Fische, 2. Auflage, Gustav Fischer
Verlag, Stuttgart

Aldermann, D.J. and C.J. Rodgers (1984):

The effects of precision mesh filtration on pro-
liferative kidney disease infectivity.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 38 - 39

Aldrin, J.F., Mevel, M. et J.Y. Robert (1977):

Premières observations sur la corynébactériose des salmonidés en Bretagne.

Bull. Off. int. Epiz. 87, 499 - 503

Aldrin, J.F., Mevel, M., Robert, J.Y., Vigneuille, M. et F.

Baudin-Laurencin (1978):

Incidences métaboliques de la corynébactériose expérimentale chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch*).

Bull. Soc. Sci. Vét. Med. comparée, Lyon, 80, 79 - 90

Alexander, J.B., Wilson, J.G.M. and W.E. Kershaw (1970):

Immune response in salmon.

J. Fish Biol. 2, 384

Allison, L.N. (1958):

Multiple sulfa therapy of kidney disease among brook trout.

Prog. Fish Cult. 20, 66 - 68

Ambrosius, H. (1966):

Comparative investigation of immune globulins of various vertebrate classes.

Nature 209, 524

Ambrosius, H. und W. Schäker (1964):

Beiträge zur Immunbiologie poikilothermer Wirbeltiere.

I. Immunologische Untersuchungen an Karpfen (*Cyprinus carpio* L.).

Zool. Jb. Physiol. 71, 73 - 88

Amend, D.F. and K.A. Johnson (1984):

Evidence for lack of antigenic competition among various combinations of *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas salmonicida* and *Renibacterium salmoninarum* bacterins when administered to salmonid fishes.

J. Fish Dis. 7, 293 - 299

Amlacher, E. (1981):

Taschenbuch der Fischkrankheiten. 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Amlacher, E. (1986):

Taschenbuch der Fischkrankheiten. 5. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena

Anderson, D.P. and G.W. Klontz (1970):

Precipitating antibody against *Aeromonas salmonicida* in serums of inbred albino rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Fish. Res. Board Can. 27, 1389 - 1393

Ashley, L.M. (1967):

Renal neoplasms of rainbow trout.

Bull. Wildl. Dis. Ass. 3, 86

Austin, B., Bucke, D., Feist, S. and J. Rayment (1985):

A false positive reaction in the indirect fluorescent antibody test for *Renibacterium salmoninarum* with a "coryneform" organism.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 8

Austin, B. and C.J. Rodgers (1980):

Diversity among strains causing bacterial kidney
disease in salmonid fish.
Curr. Microbiol. 3, 231 - 235

Austin, B., Embley, T.M. and M. Goodfellow (1983):

Selective isolation of *Renibacterium salmoninarum*.
FEMS Microbiol. Lett. 17, 111 - 114

Avtalion, R.R. (1981):

Induction of immunological tolerance in carp and its
possible implication in seasonal diseases of fish.
In: Van Muiswinkel, W.B., *Immunology and Immunization*,
Developmental and Comparative Immunology suppl.2

Avtalion, R.R., Weiss, E. and T. Moalem (1976):

Regulatory effects of temperature upon immunity in
ectothermic vertebrates.
In: Marchalonis, J.J., *Comparative Immunology*,
Blackwell Scientific Publications, Oxford

Avtalion, R.R., Wishkovsky, A. and D. Katz (1980):

Regulatory effect of temperature on specific
suppression and enhancement of the humoral response in
fish.
In: Manning, M.J., *Phylogeny of Immunological Memory*,
Elsevier/North Holland Biochemical Press, Amsterdam

Avtalion, R.A., Wojdani, A., Malik, Z., Shahrabani, R. and M.
Duczyminer (1973):

Influence of environmental temperature on the immune
response in fish.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 61, 1 - 35

Awakura, T. (1978):

Bacterial kidney disease in mature salmonid.
Fish Pathol. 13, 53 - 54

Babes, V. und P. Riegler (1903):

Über eine Fischepidemie bei Bukarest.
Zentbl. Bakt. Paras. Kde Abt.1 Orig. 33, 438 - 449

Baudin-Laurencin, F., Vigneuille, M. et M. Mevel (1977):

Premières observations sur la Corynebactériose des
Salmonidés en Bretagne.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 505 - 507

Beasley, A.R., Sigel, M.M. and L.W. Clem (1966):

Latent infection in marine fish cell tissue cultures.
Proc. Soc. exp. Biol Med. 121, 1169 - 1174

Belding, D.L. and B. Merrill (1935):

A preliminary report upon a hatchery disease of the
salmonidae.
Trans. Am. Fish. Soc. 65, 76 - 84

Bell, G.R. (1961):

Two epidemics of apparent kidney disease in cultured
pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*).
J. Fish Res. Board Can. 18, 559 - 562

Bendele, R.A. Jr. and G.W. Klontz (1975):

Histopathology of teleost kidney diseases.
In: Ribelin, W.E. and G.Migaki, The Pathology of
Fishes, The University of Wisconsin Press, London

Bisset, K.A. (1946):

The influence of temperature on non-specific
infections of fish.

J. Path. Bact. 58, 251 - 258

Bisset, K.A. (1947):

Bacterial infection and immunity on lower vertebrates
and invertebrates.

J. Hyg. Camb. 45, 128 - 135

Bisset, K.A. (1948 a):

Natural antibodies in the blood serum of freshwater
fish.

J. Hyg. Camb. 46, 267 - 268

Bisset, K.A. (1948 b):

The effect of temperature upon antibody production in
cold-blooded vertebrates.

J. Path. Bact. 60, 87 - 92

Bradshaw, C.M., Clem, L.W. and M. M. Sigel (1969):

Immunologic and immunochemical studies on the gar
(*Lepisosteus platyrhynchus*). I. Immune responses and
characterization of antibody.

J. Immunol. 103, 496 - 504

Bradshaw, C.M., Richard, A.S. and M.M. Sigel (1971):

Immunoglobulins of holostean fish.

Fed. Proc. Fed. Am. Socs. exp. Biol. 30, 887

Bradshaw, C.M. and M.M. Sigel (1968):

Cold agglutinins in a primitive fish, the Gar
(*Lepisosteus platyrhynchus*).

Fed. Proc. Fed. Am. Socs. exp. Biol. 28, 819

- Brown, R.C. and H.C. Hopps (1973):
Staining bacteria in tissue sections: A reliable Gram stain method.
Am. J. Clin. Pathol. 60, 234 - 240
- Bruno, D.W. and A.L. Munro (1982):
Detection of the causative agent of bacterial kidney disease.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2, 11 -12
- Bullock, G.L. Conroy, D.A. and S.F. Snieszko (1971):
Bacterial Diseases of Fishes.
In: Bullock, G.L. and H.R. Axelrod, Diseases of Fishes, Book 2A, T.F.H. Publications, New York, Toronto
- Bullock, G.L., Griffin, B.R. and H.M. Stuckey (1980):
Detection of corynebacterium salmoninus by direct fluorescent antibody test.
Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 719 - 721
- Bullock, G.L. and S.F. Snieszko (1969):
Bacteria in blood and kidney of apparently healthy hatchery trout.
Trans. Am. Fish. Soc. 98, 268 - 271
- Bullock, G.L. and H.M. Stuckey (1975):
Fluorescent antibody identification an detection of the corynebacterium causing kidney diseases of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 32, 2224 - 2227

- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and P.K. Chen (1974):
Corynebacterial kidney disease of salmonids: Growth
and serological studies of the causative bacterium.
Appl. Microbiol. 28, 811 - 814
- Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and D. Mulcahy (1978):
Corynebacterial kidney disease: egg transmission
following iodophore disinfection.
Fish Health News 7, 51 - 57
- Carl, G.C., Clemens, W. and A. Lindsey (1977):
The Freshwater Fishes of British Columbia.
Handbook Nr.5 of the British Columbia Provincial
Museum, Canada
- Chen, P.K., Bullock, G.L., Stuckey, H.M. and A.C. Bullock
(1974):
Serological diagnosis of corynebacterial kidney
disease of salmonids.
J. Fish. Res. Board Can. 31, 1939 - 1940
- Chiller, J.M., Hodgins, H.O., Chambers, V.C. and R.S. Weiser
(1969 a):
Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
I. Immunocompetent cells in the spleen and anterior
kidney.
J. Immunol. 102, 1193 - 1201
- Chiller, J.M., Hodgins, H.O. and R.S. Weiser (1968):
Characteristics and application of the Jerne test in
studies of the immune response of rainbow trout (*Salmo*
gairdneri).
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. exp. Biol. 27, 1551

- Chiller, J.M., Hodgins, H.O. and R.S. Weiser (1969 b):
Antibody response in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
II. Studies on the kinetic development of antibody-
producing cells and on complement an natural
hemolysin.
J. Immunol. 102, 1202 - 1207
- Cisar, J.O. and J.L. Fryer (1974):
Characterization of anti-aeromonas salmonicida
antibodies from coho salmon.
Inf. Immun. 9, 236 - 243
- Christensen, P., Kahlmeter, G., Jonsson, S. and G. Kronvall
(1973):
New method for the serological grouping of strepto-
cocci with specific antibodies adsorbed to protein
A-containing staphylococci.
Inf. Immun. 7, 881 - 885
- Clem, L.W., De Boutand, F. and M.M. Sigel (1967):
Phylogeny of immunoglobulin structure and function.
II. Immunoglobulins of the nurse shark.
J. Immunol. 99, 1226 - 1235
- Clem, L.W. and W.E. McLean (1975):
Phylogeny of immunoglobulin structure and function.
VII. Monomeric and tetrameric immunoglobulins of the
margate, a marine teleost fish.
J. Immunol. 29, 791 - 799

- Clem, L.W., McLean, W.E., Shankey, V.T. and M.A. Cuchens
(1977):
Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. I. Membrane
immunoglobulins of teleost lymphocytes.
Develop. Comp. Immunol. 1, 105 - 118
- Clem, L.W. and M.M. Sigel (1963):
Comparative immunochemical and immunological reactions
on marine fishes with soluble, viral and bacterial
antigens.
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Exp. Biol. 22, 1138 - 1144
- Clem, L.W. und P.A. Jr. Small (1967):
Phylogeny of immunoglobulin structure and function. I.
Immunoglobulins of the lemon shark.
J. exp. Med. 125, 843 - 920
- Coons, A.H., Creech, H.J. and R.N. Jones (1941):
Immunological properties of an antibody containing a
fluorescent group.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 47, 200
- Coons, A.H., Creech H.J., Jones, R.N. and E. Berliner (1942):
The demonstration of pneumococcal antigen in tissues
by the use of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45, 159
- Corbel, M.J. (1975):
The immune response in fish: a review.
J. Fish Biol. 7, 539 - 563

- Cuchens, M.A. and L.W. Clem (1977):
Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells.
Cell. Immunol. 34, 219 - 230
- Culling, C.F.A. (1974):
Handbook of histopathological and histochemical technique. Butterworths, 1974
- Cushing, J.E. Jr. (1945):
A comparative study of complement. I. Specific inactivation of the components.
J. Immunol. 50, 61 - 89
- DeCew, M.G. (1972):
Antibiotic toxicity, efficacy and teratogenicity on adult spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).
J. Fish. Res. Board Can. 29, 1513 - 1517
- Döller, G. and P.J. Enzmann (1982):
Induction of baculovirus specific antibodies in rainbow trout and carp.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 2, 53 - 55
- Dorson, M. (1972 a):
Some characteristics of antibodies in the primary immune response of rainbow trout, *Salmo gairdneri*.
Mawdesley-Thomas, Diseases of Fish, Academic Press, London, New York

Dorson, M. (1972 b):

La réponse immunitaire chez la truite arc-en-ciel
(*Salmo gairdneri*); quelques caractéristiques des
immunoglobulins produites lors d'une réaction
primaire.

Ann. Rech. vét. 3, 93 - 107

Dorson, M., Barde, A. and P. de Kinkelin (1975):

Egtved virus induced rainbow trout interferon: some
physicochemical properties.

Ann. Microbiol. 126 B, 485 - 489

D'Silva, J., Mulcahy, M.F. and P. de Kinkelin (1984):

Experimental transmission of proliferative kidney
disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Fish Dis. 7, 235 - 239

Duff, D.C. B. (1942):

The oral immunization of trout against bacterium
salmonicida.

J. Immunol. 44, 87 - 94

Earp, B.J., Ellis, C.H. and E.J. Ordal (1953):

Kidney disease in young salmon.

Wash. Dept. Fish. Spec. Rep. Ser. Nr.1, 74 S.

Edward, E.A. and G.L. Larson (1974):

New method of grouping beta-hemolytic streptococci
directly on sheep blood agar plates by coagglutination
of specifically sensitized protein A-containing sta-
phylococci.

Appl. Microbiol. 28, 972 - 976

Ehlinger, N.F. (1963):

Kidney disease in lake trout complicated by
lymphosarcoma.

Prog. Fish Cult. 25, 3 - 7

Ellis, A.E. (1976):

Leucocytes and related cells in the plaice
(*Pleuronectes platessa*).

J. Fish Biol. 8, 143 - 156

Ellis, A.E. (1977 a):

The leucocytes of fish: A review.

J. Fish Biol. 11, 453 - 491

Ellis, A.E. (1977 b):

Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*.
Histogenesis of the membrane immunoglobulin and mixed
leucocyte reactivity.

In: Solomon, J.B. and J.D. Horton, Developmental
Immunobiology, Elsevier/North Holland Biochemical
Press, Amsterdam

Ellis, A.E. (1980):

Antigen trapping in the spleen and kidney of the
plaice (*Pleuronectes platessa*).

J. Fish Dis. 3, 413 - 426

Ellis, A.E. (1982):

Differences between the immune mechanisms of fish and
higher vertebrates.

In: Roberts, R.J., Microbial Diseases of Fish, Special
Publications of the Society for General Microbiology,
Nr. 9, Academic Press, London

- Ellis, A.E., McVicar, A.H. and A.L.S. Munro (1982):
A preliminary report on the epidemiology of
proliferative kidney disease in brown trout (*Salmo
trutta*) and atlantic salmon (*Salmo salar*) in
Scotland.
Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 2, 13 - 15
- Ellis, R.W., Novotny, A.J. and L.W. Harrell (1978):
Case report of kidney disease in a wild chinook
salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, in the sea.
J. Wildl. Dis. 14, 120 - 123
- Ellis, A.E. and R.M.E. Parkhouse (1975):
Surface immunoglobulin on the lymphocytes of the
skate, *Raja naevus*.
Europ. J. Immunol. 5, 726 - 728
- Embley, T.M., Goodfellow, M. and B. Austin (1982):
A semi-defined growth medium for *Renibacterium
salmoninarum*.
FEMS Microbiol. Lett. 14, 299 - 301
- Emmrich, F., Richter, R.F. and H. Ambrosius (1975):
Immunoglobulin determinants on the surface of lymphoid
cells in carp.
Europ. J. Immunol. 5, 76 - 78
- Espmark, J.A., Grandieu M. and N.R. Bergquist (1971):
Quantitative evaluation of direct and indirect immuno-
fluorescence test for viral antigen.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 177, 98

- Etlinger, H.M., Hodgins, H.O. and J.M. Chiller (1976):
Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for
lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by
the organ distribution of mitogenic responses.
J. Immunol. 116, 1547 - 1553
- Everhart, D.L. (1972):
Antibody response of goldfish to a protein immunogen
and to haptenic determinants.
Immunology 22, 503 - 507
- Evelyn, T.P.T. (1971):
The agglutination response in sockeye salmon
vaccinated intraperitoneally with a heat-killed
preparation of the bacterium responsible for salmonid
kidney disease.
J. Wildl. Dis. 7, 328 - 335
- Evelyn, T.P.T. (1977):
An improved growth medium for the kidney disease
bacterium and some notes on using the medium.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 511 - 513
- Evelyn, T.P.T., Hoskins, G.E. and G.R. Bell (1973):
First record of bacterial kidney disease in an
apparently wild salmonid in British Columbia.
J. Fish. Res. Board Can. 30, 1578 - 1580
- Evelyn, T.P.T., Ketcheson, J.E. and L. Prosperi-Porta (1981):
The clinical significance of immunofluorescence-based
diagnoses of the kidney disease carrier.
Fish Pathol. 15, 293 - 300

- Evelyn, T.P.T., Prosperi-Porta, L. and J.E. Ketcheson (1984):
The salmonid egg as a vector of the kidney disease
bacterium *Renibacterium salmoninarum*.
Fish Diseases - Enfermedades de los Peces, Fourth
COPRAQ Session, Cadiz 1981, Hrsg. Acnigrup, Spanien
- Fijan, N. (1977):
Corynebacteriosis (dee disease, kidney disease) of
salmonids in Yugoslavia.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 509
- Fletcher, T.C. and P.T. Grant (1969):
Immunoglobulins on the serum and mucus of the plaice
(*Pleuronectes platessa*).
Biochem. J. 115, 65
- Fletcher, T.C. and A. White (1973):
Antibody production in the Plaice after oral and
parenteral immunization with vibrio anguillarum
antigens.
Aquacult. 1, 417 - 428
- Forsgren, A. and J. Sjöquist (1966):
Protein A from staphylococcus aureus.
J. Immunol. 97, 822 - 827
- Frantsi, C., Flewelling, T.C. and K.G. Tidswell (1975):
Investigations on corynebacterial kidney disease and
diplostomum sp. (eye fluke) at Margaree hatchery 1972-
73.
Environment. Canada Fisheries and Marine Service.
Resource Development Branch Maritimes Region,
Technical report series MAR T-75-9

- Fryer, J.L. and J.E. Sanders (1981):
Bacterial kidney disease of salmonid fish.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 237 - 298
- Fuhrmann, H. (1983):
Vorkommen und Bedeutung fischpathogener Erreger in
Fischhaltungen Nordwestdeutschlands.
Diss. Hannover
- Gaines, J.L.Jr. and W.A. Rogers (1975):
Some skin lesions of fishes.
In: Ribelin, W.E. und G. Migaki, The Pathology of
Fishes, University of Wisconsin Press
- Gewurz, H., Finstad, J. Muschel, L.H. und R.A. Good (1966):
Phylogenetic inquiry in to the origins of the
complement system.
In: Smith, R.T. et al., Phylogeny of Immunity,
University of Florida Press, Gainesville
- Ghittino, P., Andruetto, S. and E. Viglani (1977):
Recent findings in trout kidney pathology in Italy.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 491 - 493
- Grace, M.F. (1981):
The functional histogenesis of the immune system in
rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson 1836.
Ph. D. Thesis, University of Hull
- Grace, M.F. and M.J. Manning (1980):
Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout,
Salmo gairdneri Richardson 1836.
Developmental and Comparative Immunology 4, 255 - 264

- Grace, M.F., Botham, J.W. and M.J. Manning (1981):
Ontogeny of lymphoid organ function in fish.
In: Solomon, J.B., Aspects of Developmental and
Comparative Immunology I, Pergamon Press, Oxford
- Gravell, M. and R.S. Malsberger (1965):
A permanent cell line from the fathead minnow
(*Pimcephales promelas*).
Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 555 - 565
- Grey, H.M. (1963):
Phylogeny of the immune response. Studies on some
physical, chemical and serological characteristics of
antibody produced in the turtle.
J. Immunol. 91, 819 - 825
- Hahnel, G.B., Gould, R.W. and E.S. Boatman (1983):
Serological comparison of selected isolates of
Aeromonas salmonicida sp. *salmonicida*.
J. Fish Dis. 6, 1 - 11
- Harris, J.E. (1972):
The immune response of a cyprinid fish to infections
of the acanthocephalan, *Pomphorhynchus laevis*.
Int. J. Parasit. 2, 459 - 469
- Harrison, J.G. (1977):
Salmonid renal histopathology.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 495 - 496
- Hedrick, R.P., Kent, M.L., Rosemark, R. und D. Manzer (1984):
Occurrence of proliferative kidney disease (PKD) among
Pacific salmon and steelhead trout.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 34 - 37

- Hendricks, J.D. and S.L. Leek (1975):
Kidney disease postorbital lesions in spring chinook
salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).
Trans. Am. Fish. Soc. 104, 805 - 807
- Hildemann, W.H. and G.H. Thoenes (1969):
Immunological responses of pacific hagfish.
Transplantation 7, 506 - 521
- Hirst, K.G. (1941):
The agglutination of red cells by allantoic fluid of
chick embryo infected with influenza virus.
Science 94, 22
- Hodgins, H.O., Weiser, R.S. and G.J. Ridgeway (1967):
The nature of antibodies and the immune response in
rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
J. Immunol. 99, 534 - 544
- Hoffmann, R. and H. Dangschat (1981):
A note on the occurrence of proliferative kidney
disease in Germany.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 81, 33
- Hoffmann, R. and R. Lommel (1984):
Haematological studies in proliferative kidney disease
of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.
J. Fish Dis. 7, 323 - 326
- Hoffmann, R., Popp, W. and S. van de Graaff (1984):
Atypical BKD predominantly causing ocular and skin
lesions.
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 7 - 9

Hoffmann, R. and R. Lommel (1984):

Haematological studies in proliferative kidney disease
of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson.

J. Fish Dis. 7, 323 - 326

Hoffmann, R., Popp, W. and S. van de Graaff (1984):

Atypical BKD predominantly causing ocular and skin
lesions.

Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 4, 7 - 9

Hunn, J.B. (1964):

Some patho-physiological effects of bacterial kidney
disease in brook trout.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 117, 383 - 385

Iwama, G.K. (1980):

Incubation times resulting from experimental
injections of kidney disease bacteria into juvenile
coho salmon.

Pro. Fish Cult. 42, 182 - 183

Iwama, G.K. and G.L. Greer (1980):

Effect of bacterial infection on the toxicity of
sodium pentachlorophenate to juvenile coho salmon.

Trans. Am. Fish. Soc. 109, 290 - 292

Jensen, J.O.T., McLean, W.E. and D.F. Alderice (1981):

Effects of accessory factors on survival of newly
fertilized salmonid eggs treated with an antibiotic.

Aquaculture 23, 295 - 307

- Johnson, G.D. and E.J. Holborow (1973):
In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology,
Vol 1, Immunochemistry 2. Auflage, Blackwell
Scientific Publications, London
- Johnson, G.D., Holborow, E.J. and J. Darling (1974):
Immunofluorescence and immunoenzyme techniques.
In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology,
Immunochemistry, 3. Auflage, Blackwell Scientific
Publications, London
- Kettler, S., Hoffmann, R. and C. Pfeil-Putzien (1985):

Infection of grayling (*Thymallus thymallus*) with the
agent of bacterial kidney disease. (im Druck)
- Kimura, T. (1978):
Bacterial kidney disease of salmonids.
Fish Pathol. 13, 43 - 52
- Kimura, T. und T. Awakura (1977):
Bacterial kidney disease of salmonids: First observa-
tion in Japan.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 43, 143 - 150
- Kimura, T. und M. Yoshimizu (1981 a):
Rapid method for detection of bacterial kidney disease
of Salmonid (BKD) by coagglutination of antibody
sensitized protein A-containing staphylococci.
Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 1173 - 1183

Kimura, T. and M. Yoshimizu (1981 b):

A coagglutination test with antibody-sensitized staphylococci for rapid and simple diagnosis of bacterial kidney disease (BKD).

International Symposium on Fish Biologics:

Serodiagnostics and Vaccines, Leetown, W.Va., U.S.A.

1981, Develop. biol. Standard. 49, S.Karger, Basel

Kinkelin de, P. (1974):

Corynébactériose des salmonidés: première observation en France.

Bull. Franç. de Piscicult. 254, 3 - 8

Kinkelin de, P. and M. Dorson (1973):

Interferon production on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with egtd virus.
J. gen. Virol. 19, 125 - 127

Klontz, G.W. (1972):

Haematological techniques and the immune response in rainbow trout.

Symp. Zool. Soc. Lond. 30, 89 - 99

Klontz, G.W. (1982):

Bacterial kidney disease in Salmonids. An overview.
Presented at: The International Symposium on the
Antigens of Fish Pathogens: Development and Production
of Vaccines and Serodiagnostics. May 1982, Talloires,
France

Klontz, G.W., Yasutake, W.T. and T.J. Parisat (1965):

Virus diseases of the Salmonidae in Western United States. III. Immunopathological aspects.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 531 - 542

Kluge, J.P. (1965):

A granulomatous disease of fish produced by
flavobacteria.

Pathologia veterinaria 2, 545 - 552

Krantz, G.E. und C.E. Heist (1970):

Prevalence of naturally acquired agglutinating
antibodies against aeromonas salmonicida in hatchery
trout in central Pennsylvania.

J. Fish. Res. Board Can. 27, 969 - 973

Krantz, G.E., Reddecliff, J.M. and C.E. Heist (1963):

Development of antibodies against aeromonas
salmonicida in trout.

J. Immunol. 91, 757 - 760

Krauel, K.K. and G.J. Ridgeway (1963):

Immunoelectrophoretic studies of red salmon
(Oncorhynchus nerka) serum.

Int. Arch. Allergy 23, 246 - 253

Kronvall, G. (1973):

A rapid slide-agglutination method for typing pneumo-
cocci by means of specific antibody adsorbed to
protein A-containing staphylococci.

J. Med. Microbiol. 6, 187 - 190

Kusser, W. and F. Fiedler (1983):

Murein type and polysaccharide composition of cell
walls from Renibacterium salmoninarum.

FEMS Microbiol. Lett. 20, 391 - 394

Laidler, L.A. (1980):

Detection and identification of the bacterial kidney disease (BKD) organism by the indirect fluorescent antibody technique.

J. Fish. Dis. 3, 67 - 69

Lallier, R., Olivier, F. Chartier, P., Turcotte, C., Dion, B., and J. Paulhus (1981):

Presence of bacterial kidney disease in salmonid fish in Quebec.

Can. Vet. J. 22, 226 - 229

Legler, D.W., Evans, E.E. and H.K. Dupree (1967):

Comparative immunology: serum complement of freshwater fishes.

Trans. am. Fish. Soc. 96, 237 - 242

Liefmann, H. (1911):

Über die Hämolyse der Kaltblüterseren.

Berlin. klin. Wschr. 48, 1682

Lillie, R.D. (1948):

Histopathologic Technic.

The Blackiston Co., Philadelphia

Linthicum, D.S. and W.H. Hildemann (1970):

Immunological responses of pacific hagfish. II. Serum antibodies to cellular antigens.

J. Immunol. 105, 912 - 918

Litmann, G.W. (1975):

Physical properties of immunoglobulins of lower species: A comparison with immunoglobulins of mammals.
In: Marchalonis, J.J., Comparative Immunology,
Blackwell, Oxford

Litman, G.W., Frommel, D., Finstad, J., Howell, J., Pollara,
B.W. and R.A. Good (1970 a):

Evolution of the immune response. VIII. Structural studies of the Lamprey immunoglobulin.
J. Immunol. 105, 1278 - 1285

Litman, G.W., Rosenberg, A. and R.A. Good (1970 b):

Conformational studies of immunoglobulin structure.
Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. exp. Biol. 29, 2982

Lobb, C.J. and L.W. Clem (1981 a):

The metabolic relationship of the immunoglobulins in fish serum, cutaneous mucus and bile.
J. Immunol. 127, 1525 - 1529

Lobb, C.J. and L.W. Clem (1981 b):

Phylogeny of immunoglobulin structure and function.
XI. Secretory immunoglobulins in the cutaneous mucus of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*.
Develop. Comp. Immunol. 5, 587 - 596

Luk'yanenko, V.J. (1965):

Inter-species differences in the frequency of detection and the concentration level of serum lysozyme in fishes.
Izv. Akad. Nank. SSSR. Ser. Biol. 3, 409 - 413

Luk'yanenko, V.J. (1966):

Antibody forming function of fish and the effect of an antigenic stimulant on the humoral factors of natural immunity.

Gidrobiol. Zh. 2, 38 - 46

Mackie, T.J., Arkwright, J.A. and T.E. Pryce-Tannatt (1933):

Second Interim Report of the Furunculosis Committee.

His Majesty's Stationary Off., Edinburgh, Scotland

MacLean, D.G. and W.G. Yoder (1970):

Kidney disease among Michigan salmon in 1967.

Prog. Fish Cult. 32, 26 - 30

Mackie, J.M. and C.S. Wardle (1971):

Electrophoretic identification of lymph from muscle tissue of plaice (*Pleuronectes platessa* L.)

Int. J. Biochem. 2, 409 - 413

Manning, M.J., Grace, M.F. and C.J. Secombes (1982):

Developmental aspects of immunity and tolerance in fish.

In: Roberts, R.J., Microbial Diseases of Fish,
Academic Press, London

Marchalonis, J.J. (1969):

Isolation and characterization of immunoglobulin-like proteins of the Australian lungfish (*Neoceratodus forsteri*).

Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 47, 405 - 419

Marchalonis, J.J. (1971):

Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*).

Immunology 20, 161 -173

Marchalonis, J.J. and G.M. Edelman (1968):

Phylogenetic origins of antibody structure. III. Antibodies in the primary immune response of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*.

J. exp. Med. 127, 891 - 914

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und G.Wittmann (1977 a):

Virologische Arbeitsmethoden, Bd.I, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Mayr, A., Bachmann, P.A., Bibrack, B. und G. Wittmann (1977 b):

Virologische Arbeitsmethoden, Bd.II, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

McCarthy, D.H., Croy, T.R. and D.F. Amend (1984):

Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against bacterial kidney disease: preliminary efficacy evaluation.

J. Fish. Dis. 7, 65 - 71

McCarthy, D.H. and K.A. Johnson (1982):

A serotypic survey and cross-protection test of North American field isolates of *Yersinia ruckeri*.

J. Fish. Dis. 5, 323 - 328

McClelland, L. and R. Hare (1941):

The adsorption of influenza virus by red cells and a new in vitro method for measuring antibodies for influenza virus.

Can. J. Publ. Hlth. 37, 530

McKinney, E.C., Smith, S.B. Haines, H.G. and M.M. Sigel (1977):

Phagocytosis by fish cells.

J. of Reticuloendothelial Soc. 21, 89 - 95

Michel, C. and B. Faivre (1982):

Occurrence and significance of agglutinating
antibodies in experimental furunculosis of rainbow
trout, *Salmo gairdneri* Richardson.

J. Fish Dis. 5, 429 - 432

Millan, L.M. (1977):

New diseases in Salmon culture in Spain.

Bull. Off. int. Epiz. 87, 515 - 516

Mitchum, D.L. and L.E. Sherman (1981):

Transmission of bacterial kidney disease from wild to
stocked hatchery trout.

Can. J. Fish. Aquat. Sci. 38, 547 - 551

Mitchum, D.L., Sherman, L.E. and G.T. Baxter (1979):

Bacterial kidney disease in feral populations of brook
trout (*Salvelinus fontinalis*), brown trout (*Salmo*
trutta), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Fish. Res. Board. Can. 36, 1370 - 1376

Morrison, C., Cornick, J., Shum, G. and B. Zwicker (1981):

Microbiology and histopathology of saddle back disease
of underyearling atlantic salmon (*Salmo salar*).

J. Fish Dis. 4, 243 - 258

Munro, A.L.S. (1982):

The Pathogenesis of Bacterial Diseases of Fishes.

In: Roberts, R.J., Microbial Diseases of Fish,

Academic Press, London

Noguchi, H. (1903):

A study of immunization - hemolysins, agglutinins,
precipitins, and coagulins in cold-blooded animals.
Zentbl. Bakt. Parasitkde. Abt.I, Orig. 33, 353 - 362

Nonaka, M, Yamaguchi, N, Natsuume-Sakai, S. and Takashi, M.
(1981):

The complement system of rainbow trout (*Salmo*
gairdneri). I. Identification of the serum lytic
system homologous to mammalian complement.
J. Immunol. 126, 1489 - 1494

Nybelin, O. (1935):

Über Agglutininbildung bei Fischen.
Z. Immun. Forsch. exp. Ther. 84, 74 - 79

Oie, K.H. and P.C. Loh (1969):

Reovirus Type II: Induction of viral resistance and
interferon production in fathead minnow cells.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 136, 369 - 373

Ollenschläger, B. (1978):

Immunreaktion beim Fisch.
In: DVG e.V. - Fachgruppe Tierseuchenrecht, Diagnose
und Bekämpfung von Fischkrankheiten, München

Ordal, E.J. and B.J. Earp (1956):

Cultivation and transmission of etiological agent of
kidney disease in salmonid fishes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 85 - 88

Ouchterlony, Ö. (1958):

Diffusion in gel methods for immunological analysis.
In: Kallos, P., Progress in Allergy Vol V, Karger-
verlag, Basel und New York

Ouchterlony, Ö. (1962):

Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

In: Kallos, P. und B.H. Waksman, Progress in Allergy

Vol. VI, Karger Verlag, Basel und New York

Ouchterlony, Ö. and L.A. Nilsson (1973):

Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.

In: Weir, D.M., Handbook of experimental immunology,

Blackwell Scientific Publications, London

Papermaster, B.W., Condie, R.M., Finstad, J. and Good R.A.

(1964):

Evolution of the immune response. I. The phylogenetic development of adaptive immunologic responsiveness in vertebrates.

J. exp. Med. 119, 105 - 130

Paterson, W.D. (1977):

The antibody response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to *aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis.

Diss. Abstr. Int. 33 B, 344-B

Paterson, W.D., Desautels, D. and J.M. Weber (1981 a):

The immune response of atlantic salmon, *Salmo salar* L., to the causative agent of bacterial kidney disease, *Renibacterium salmoninarum*.

J. Fish. Dis. 4, 99 - 111

Paterson, W.D., Gallant, C. Desautels, D. and L. Marshall
(1979):

Detection of bacterial kidney disease in wild
salmonids in the Margaree river system and adjacent
waters using a indirect fluorescent antibody
technique.

J. Fish. Res. Board Can. 36, 1464 - 1468

Paterson, W.D., Lall, S.P. and D. Desautels (1981 b):

Studies on bacterial kidney disease in atlantic
salmon (*Salmo salar*) in Canada.

Fish Pathol. 15, 283 - 292

Pfeil-Putzien, C., Hoffmann, R. and W. Popp (1985 a):

Preliminary report on the occurrence of BKD in Germany
Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 5, 30 - 31

Pfeil-Putzien, C., Hoffmann, R. , Popp, W. und M. Schauner
(1985 b):

Zur Verbreitung der Bacterial Kidney Disease (BKD)
der Salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland.

Zbl. Vet. Med. B 32, 541 - 547

Pippy, J.H. (1969):

Kidney disease in juvenile atlantic salmon (*Salmo*
salar) in the Margaree River.

J. Fish Res. Board Can. 26, 2535 - 2537

Piper, R.G. (1961):

Toxic effects of erythromycin thiocyanate on rainbow
trout.

Prog. Fish Cult. 23, 134 - 135

Pliszka, F. (1939 a):

Weitere Untersuchungen über Immunitätsreaktionen und
über Phagozytose bei Karpfen.

Zentbl. Bakt. Parasitkde. Abt. I. Orig. 143, 451 - 460

Pliszka, F. (1939 b):

Untersuchungen über die Agglutinine bei Karpfen.

Zentbl. Bakt. Parasitkde. Abt. Orig. 143, 262 - 264

Pollara, B., Benson, S. and R.A. Bridges (1968 a):

Erythrocyte agglutinins in the sea lamprey (*Petromyzon
marinus*).

Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol. 27, 492

Pollara, B., Litman, G.W., Finstad, J., Howell, J. and R.A.

Good (1970):

Evolution of the immune response. VII. Antibody to
human O cells and properties of the immunoglobulin in
lamprey.

J. Immunol. 105, 738 - 745

Polli, B. (1982):

Die immunologische Abwehrreaktion von Fischen gegen
Saprolegnia.

Diss. ETH Nr.6908, Zürich

Popp, W. (1980):

Bakterien als Erreger infektiöser Fischkrankheiten.

In: Reichenbach-Klinke, Krankheiten und Schädigungen

der Fische, 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Post, G. (1963):

The immune response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
to *aeromonas hydrophila*.

State of Utah Department of Fish and Game,
Departmental Information Bulletin, U.S.A.

Post, G. (1966 a):

Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to
antigens of *aeromonas hydrophila*.

J. Fish. Res. Board Can. 23, 1487 - 1494

Post, G. (1966 b):

Serum proteins and antibody production in rainbow
trout (*Salmo gairdneri*).

J. Fish. Res. Board Can. 23, 1957 - 1963

Remane, A., Storch, V. und U. Welsch (1980):

Systematische Zoologie.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York

Riggs, I.L. and G.C. Brown (1961):

Direct and indirect immunofluorescence of
enteroviruses.

Bact. Proc. 23, 145

Riggs, J.L., Seiwald, R.L., Burchhalter, J.H., Downs, C.M.
and T.G. Metcalf (1958):

Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling
agents for immune serum.

Amer. J. Path. 34, 1081

Rijkers, G.T., Frederic-Wolters, E.M.H. and W.B. van Muiswinkel
(1980):

The immune system of cyprinid fish. Kinetics and
temperature dependence of antibody-producing cells in
carp (*Cyprinus carpio*).

Immunology 41, 91 - 97

Roberts, R.J. (1975):

Melanin-containing cells of teleost fish and their
relation to disease.

In: Ribelin, W.E. und G. Migaki, The Pathology of
Fishes, University of Wisconsin Press

Roberts, R.J. (1978):

The Bacteriology of Teleosts.

In: Roberts, R.J., Fish Pathology, Bailliere Tindall,
London

Roberts, R.J., Shearer, W.M., Munroe, A.L.S., and K.G.R. Elson
(1969):

The pathology of ulcerative dermal necrosis of
Scottish salmon.

J. Path. 97, 563 - 565

Rolle, M., und A. Mayr (1985):

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

5. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart

Rucker, R.R., Earp, B.J. and E.J. Ordal (1953):

Infectious Diseases of Pacific Salmon.

Trans. Am. Fish. Soc. 83, 297 - 312

Sakai, D.K. (1981 b):

Heat inactivation of complements and immune hemolysis reaction in rainbow trout, masou salmon, coho salmon, goldfish and tilapia.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47, 565 - 571

Sanders, J.E. and J.L. Fryer (1980):

Renibacterium salmoninarum gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes.

Int. J. Syst. Bacteriol. 30, 496 - 502

Sanders, J.E., Pilcher, K.S. and J.L. Fryer (1978):

Relation of water temperature to bacterial kidney disease in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), sockeye salmon (*O. nerka*) and steelhead trout.

J. Fish. Res. Board Can. 35, 8 - 11

Schäperclaus, W. (1979):

Fischkrankheiten. 4. Aufl., Akademie Verlag, Berlin

Schauner, M., Hoffmann, R. und C. Pfeil-Putzien (1985):

Bakterielle Nierenerkrankung der Salmoniden (BKD) als Problem der Forellenteichwirtschaft.

Fischer und Teichwirt 36, 162 - 164

Schlumberger, H.G. and B. Lucke (1948):

Tumors characteristic for certain animal species: A review of fishes, amphibians and reptiles.

Cancer Res. 8, 657 - 712

Secombes, C.J. and M.J. Manning (1980):

Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp, *Cyprinus carpio* L.

J. Fish Dis. 3, 399 - 412

Secombes, C.J. Manning, M.J. and A.E. Ellis (1980):

Antigen-trapping in the carp, *Cyprinus carpio*.

In: Solomon, J.B., Aspects of Developmental and Comparative Immunology I, Pergamon Press, Oxford

Serero, M. and R.R. Avtalion (1978):

Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity in ectothermic vertebrates. III. Establishment of immunological suppression in fish.

Developmental and Comparative Immunology 2, 87 - 94

Shelton, E. and M. Smith (1970):

The ultrastructure of carp (*Cyprinus carpio*) immunoglobulin: a tetrameric macroglobulin.

J. Mol. Biol. 54, 615 - 617

Sigel, M.M. and L.W. Clem (1965):

Antibody response of fish to viral antigens.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 662 - 677

Smith, I.W. (1964):

The occurrence and pathology of Dee Disease.

Freshwater and Salmon Fisheries Research 34, 3 - 9

Smith, C.E., Morrison, J.K., Ramsey, H.W. and H.W. Ferguson (1984):

Proliferative kidney disease: first reported outbreak in North America.

J. Fish Dis. 7, 207 - 216

Snieszko, S.F. (1980):

Epizootologie der Fischkrankheiten.

In: Reichenbach-Klinke, H.-H., Beiträge zur
Fischpathologie und -toxikologie, Gustav Fischer
Verlag, Stuttgart

Snieszko, S.F. and P.J. Griffin (1955):

Kidney disease in brook trout and its treatment.

Prog. Fish Cult. 17, 3 - 13

Stanworth, D.R. and M.W. Turner (1973):

Immunochemical analysis of immunoglobulins and their
subunits.

In: Weir, D.M., Handbook of Experimental Immunology
Bd. 1, 2. Auflage, Blackwell Scientific Publications,
London

Steitz, E. und G. Stengel (1984):

Die Stämme und Klassen des Tierreiches.

In: Nachtigall, W., Studium Biologie, Verlag Chemie,
Weinheim, Deerbach Field - Florida, Basel

Suksuong, M. and A.S. Dajani (1977):

Detection of haemophilus influenzae type B antigens
in body fluids, using specific antibody-coated
Staphylococci.

J. Clin. Microbiol. 5, 81 - 85

Summerfelt, R.C. (1966):

Identification of a fish serum protein with antibody
activity.

Bull. Wildl. Dis. Ass. 2, 23 - 30

- Suran, A.A., Tarail, M.H. and B.W. Papermaster (1967):
Immunoglobulins of the leopard shark. I. Isolation and
characterization of 17S and 7S immunoglobulins with
precipitating activity.
J. Immunol. 99, 679 - 686
- Suzumoto, B.K., Schreck, C.B. and J.D. McIntyre (1977):
Relative resistance of three transferrin genotypes of
coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their
hematological responses to bacterial kidney disease.
J. Fish. Res. Board Can. 34, 1 - 8
- Taylor, R.D. (1966):
Modification of the Brown and Brenn gram stain for the
differential staining of gram-positive and gram-
negative bacteria in tissue sections.
Am. J. Clin. Pathol. 46, 472 - 474
- Thoenes, G.H. and W.H. Hildemann (1970):
Immunological responses of pacific hagfish. II. Serum
antibody production to soluble antigens.
In: Sterzl, J. und I. Rika, Developmental Aspects of
Antibody Formation and Structure, Bd. 2, Academic
Publishing House of Czechoslovak Academy of Science,
Prag
- Uhr, J.W., Finkelstein, M.S. and E.C. Franklin (1962):
Antibody response to bacteriophage OX, 174 in non-
mammalian vertebrates.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 13 - 15

- Van Loon, J.J.A., Van Oostom, R. and W.B. van Muiswinkel
(1980):
Development of the immune system in carp.
In: Solomon, J.B., Aspects of Developmental and
Comparative Immunology I, Pergamon Press, Oxford
- Vigneuille, M., Baudin-Laurencin, F. et M. Mevel (1977):
Premières observations sur la Corynébactériose des
Salmonidés en Bretagne. Épidémiologie.
Bull. Off. int. Epiz. 87, 497 - 498
- Wardle, C.S. (1971):
New observations on the lymph system of the plaice,
Pleuronectes, platessa and other teleosts.
J. of the Marine Biol. Ass. U.K. 51, 977 - 990
- Warr, G.W., DeLuca, D., Decker, J.M., Marchalonis, J.J. and
L.N. Ruben (1977):
Lymphoid heterogeneity in teleost fish: Studies on the
genus Carassius.
Solomon, J.B. und J.D. Horton, Developmental
Immunology, Elsevier/North Holland Biochemical Press,
Amsterdam
- Warr, G.W. and J.J. Marchalonis (1980):
Membrane immunoglobulins of teleost fish lymphocytes.
In: Solomon, J.B., Aspects of Developmental and
Comparative Immunology, Pergamon Press, Oxford
- Warren, J.W. (1963 a):
Kidney disease of salmonid fishes and the analysis of
hatchery waters.
Prog. Fish Cult. 25, 121 - 126

- Watson, L.J., Paulissen, L.J. and B. Yen-Watson (1968):
Serum protein changes and C-reactive proein presence
in fish after injection of aeromonas liquefaciens and
streptococcus OX 39.
Bact. Proc. M6, 66
- Weber, J.M. and B.M. Zwicker (1979):
Aeromonas salmonicida in atlantic salmon (Salmo
salar): Occurence of specific agglutinins to three
bacterial pathogens.
J. Fish Res. Board Can. 36, 1102 - 1107
- Wedemeyer, G.A. (1976):
Physiological response of juvenile coho salmon
(Oncorhynchus kisutch) and rainbow trout (Salmo
gairdneri) to handling and crowding stress in in-
tensive fish culture.
J. Fish Res. Board Can. 33, 2699 - 2702
- Wedemeyer, G.A. and A.J. Ross (1973):
Nutritional factors in the biochemical pathology of
corynebacterial kidney disease in the coho salmon
(Oncorhynchus kisutch).
J. Fish. Res. Board Can. 30, 296 - 298
- Wilson, J.G.M. (1976):
Immunological aspects of fungal disease in fish.
In: Gareth-Jones, E.B., Recent advances on aquatic
mycology, ELEK Science, London
- Winter, G.W., Schreck, C.B. and J.D. McIntyre (1980):
Resistance of different stocks and transferrin
genotypes of coho salmon (Oncorhynchus kisutch) and
steelhead trout (Salmo gairdneri) to bacterial kidney
disease and vibriosis.
Fishery Bull. 77, 795 - 802

Wolf, K. (1958):

Kidney disease of salmonid fishes.

U.S. Fish and Wildlife Serv., Fishery Leaflet Nr.465

Wolf, K. and C.E. Dunbar (1959 a):

Test of 34 therapeutic agents for control of kidney disease in trout.

Trans. Am. Fish. Soc. 88, 117 - 124

Wolf, K.E. and C.E. Dunbar (1959 b):

Methods of infecting trout with kidney disease and some effects of temperature on experimental infections.

U.S. Fish Wildl. Spec. Sci. Rep. Fish. Nr.286

Wolke, R.E. (1975):

Bacterial and fungal diseases.

In: Ribelin, W.E. und G. Migaki, Pathology of Fishes, University of Wisconsin Press

Wood, J.W. (1974):

Diseases of pacific salmon, their prevention and treatment.

Dep. Fish. Hatch. Div., 2.Auflage, Olympia/Wash., U.S.A.

Wood, J.W. and E.J. Ordal (1958):

Tuberculosis in pacific salmon and steelhead trout.

Res. Briefs Fish. Comm. Oregon, 25, 1 - 38

Wood, J.W. and J. Wallis (1955):

Kidney disease in adult chinook salmon and its
transmission by feeding to young chinook salmon.
Res. Briefs Fish. Comm. Oregon 6, 32 - 40

Wood, E.M. and W.T. Yasutake (1956):

Histopathology of kidney disease in fish.
Am. J. Path. 32, 845 - 857

Wood, E.M., Yasutake, W.T. and W.L. Lehman (1955):

A mycosis-like granuloma of fish.
J. infect. Dis. 97, 262 - 267

Woodall, A.N. and G. LaRoche (1964):

Nutrition of salmonid fishes: XI. Iodine requirement
of chinook salmon.
J. Nutr. 83, 475 - 481

Yamaguchi, N., Teshima, C. Kurashige, S., Saito, T. and S.

Mitsuchashi (1980):

Seasonal modulation of antibody formation in rainbow
trout (*Salmo gairdneri*).

In: Solomon, J.B. Aspects of Developmental and
Comparative Immunology I., Pergamon Press, Oxford

Yamamoto, T. (1975):

Infectious pancreatic necrosis virus and bacterial
kidney disease appearing concurrently in populations
of *Salmo gairdneri* and *Salvelinus fontinalis*.

J. Fish. Res. Board Can. 32, 92 - 95

Yasutake, W.T. (1975):

Fish viral diseases: clinical, histopathological and comparative aspects.

In: Ribelin, W.E. und G. Migaki, The Pathology of Fishes, University of Wisconsin Press

Young, C.L. and G.B. Chapman (1978):

Ultrastructural aspects of the causative agent and renal histopathology of bacterial kidney disease in brook trout (*Salvelinus fontinalis*).

J. Fish. Res. Board Can. 35, 1234 - 1248



Herrn Prof Dr. R. Hoffmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas und für seine freundliche Unterstützung bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. C. Pfeil-Putzien für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die sachliche Anleitung bedanken.

Herrn Busch danke ich für die gute Betreuung der Versuchstiere.



LEBENS LAUF

Name : Schauner
Vorname : Margit
Geburtsdatum : 25.04.1959
Geburtsort : Trostberg/Deinting, Bayern
Eltern : Frieda Schauner, geb. Fritsch
Josef Schauner
Schul Ausbildung : Volksschule Heiligkreuz
September 1965 - Juli 1969
Neusprachliches Gymnasium Trostberg
September 1969 - Juni 1978
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
29.06.1978
Studium : Tiermedizinisches Studium an der Tierärzt-
lichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München
November 1978 - März 1984
Abschluß: Staatsexamen am 21.03.1984
Approbation : 13.04.1984
Promotionsstudium : Ab April 1984 am Institut für Zoologie und
Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



